

Universidade Federal de Minas Gerais

Bruno Marçal Repolês

Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: vias de reparo mitocondrial e formação de híbridos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Belo Horizonte

Setembro de 2019

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: vias de reparo mitocondrial e formação de híbridos

Bruno Marçal Repolês

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Belo Horizonte

Setembro de 2019

043

Repolês, Bruno Marçal.

Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: vias de reparo mitocondrial e formação de híbridos [manuscrito] / Bruno Marçal Repolês. - 2019.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado.

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

1. Genética. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Reparo de DNA. 4. Recombinação homóloga. 5. Radiação ionizante. 6. Quebras de DNA de Cadeia Dupla. I. Machado, Carlos Renato. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



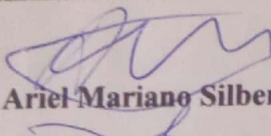
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




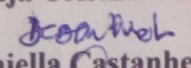
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNO MARÇAL REPOLÊS. Aos vinte e sete dias do mês de setembro de 2019 às 13h30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: vias de reparo mitocondrial e formação de híbridos"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ariel Mariano Silber (Universidade de São Paulo), aprovado; Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto (Universidade de São Paulo), aprovado; Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

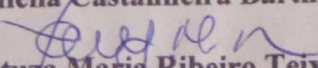
APROVADO
 REPROVADO

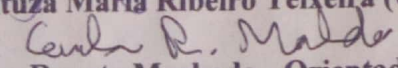
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de setembro de 2019.

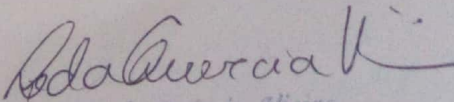

 Dr. Ariel Mariano Silber (Universidade de São Paulo)


 Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto (Universidade de São Paulo)


 Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu (UFMG)


 Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (UFMG)


 Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)


 Profª Cida Quercia Vierra
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

À todos que possibilitaram e contribuíram
para que este trabalho existisse.

Agradecimentos

Gostaria de iniciar meus agradecimentos começando pelo meu orientador, Dr. Carlos Renato Machado. Foram nove anos de convivência e orientação e seu entusiasmo pela ciência e pelo conhecimento chamaram a atenção não só de mim, mas de todos os alunos que o conhecem. No laboratório a convivência, o apoio, a compreensão e os diversos “E aí?”, “O que deu?” me ensinaram e me estimularam a sempre correr atrás e ficar cada vez mais instigado. Carlos Renato e todos com quem trabalhei no LGB me mostraram que “cada resposta apenas instiga novas perguntas”. E por mais clichê que isto possa soar, é extremamente verdadeiro quando você entende e vivencia o significado desta expressão. Por ter acreditado em mim em diversos momentos em que nem mesmo eu achava que continuaria na carreira científica; por ter me ensinado a fazer novas perguntas; por ter me dado esta oportunidade única na minha vida e por ter me ensinado coisas que vão além do conhecimento científico sou extremamente grato.

Ainda falando sobre quem me adotou, me deu oportunidades e me ensinou tanto, não posso deixar de agradecer a Dra. Carolina Furtado. Carol realmente me adotou como um filho científico e eu nunca esqueci, e nunca esquecerei, de cada uma das vezes que ela me defendeu. Não consigo imaginar ninguém melhor para me mostrar o que é o mundo da ciência. O modo como ela agia com toda a sinceridade, a forma de trabalhar, de encarar as frustrações e alegria que este mundo da ciência nos traz. Parte significativa do meu amor por este mundo da ciência é espelho da forma como fui criado. Carol foi minha “mãe” dentro do LGB, é uma pessoa que todos que conhecem são mais felizes e gratos pela amizade e eu não sou exceção. Fico muito feliz de ter tido a oportunidade de conhecer alguém em um momento tão importante quanto o início de minha vida científica. Mesmo que eu não saiba direito como demonstrar esta gratidão, torço para que todos tenham uma pessoa tão boa para aprender como eu tive.

Convivi também com diversas pessoas no grupo de reparo e agradeço a todos eles, alunos atuais e ex-alunos. Em especial agradeço à Hellida, Verônica, Selma, Paula, Clara, Lara, Anna, Adalberto, William, Roberto, Bruno 2, Pedro (e seus belos olhos), por tantos anos de convivência. Mais especial ainda agradeço ao Hugo e ao Augusto por toda imensa ajuda que me deram e pela igualmente imensa paciência que tiveram ao sempre estarem dispostos a me ouvir e aprender junto de mim. A todos alunos e ex-alunos do grupo de reparo cuja amizade se estendeu para fora do laboratório. Ao João Pedro que tornava todo

ambiente em que estava mais divertido e pelos ataques de sinceridade extrema. À Mari Babys, minha irmã científica pelo apoio tanto dentro quanto fora do laboratório. Ao Wesley, que se aventurou comigo tanto por este mundo do reparo mitocondrial, quanto por outros e foi de fundamental importância neste trabalho. Ao Antônio, que espero que se lembre de mim quando perguntarem daqui a alguns anos.

À Ceres, que tem um enorme coração e, mesmo no meio de toda aquela loucura e desorientação que as vezes eu arrumava, era garantia de risadas e certeza de que tudo daria certo. Você me ensinou o conceito de fator limitante, a relatividade do tempo e que o importante é seguir em frente contando com seus amigos. À Elizângela, que me mostrou que sarcasmo e ironia são excelentes formas de humor e que sempre que precisei me apoiou. Com certeza eu não teria alcançado este objetivo se também não fossem por vocês.

Agradeço às professoras Glória Regina e Andrea Macedo também por anos de sugestões e críticas ao meu trabalho. E também ao professor Erich Birelli, que me mostrou várias formas novas de organizar meu pensamento e minha visão sobre tudo o que fazia, além de todo o conhecimento bioquímico e nerd que compartilhou comigo.

À todos os funcionários que me ajudaram neste processo. Especialmente à Gislene e à Marisa, quem sempre me salvaram quando estava correndo para cumprir meus prazos. De forma muito especial agradeço também à Neuza Antunes e Lorrane Diniz. É importante e reconfortante saber que temos pessoas que realmente se importam conosco e com nosso bem estar enquanto estamos no trabalho.

À todos demais alunos do LGB durante todos estes anos. Gostaria de agradecer especialmente à Nayara, Dani Chame, Dani Laet, Tiago Bruno, Thomaz, Jessica, Fred, Amanda, Mainá, Viviane, Sabrina, que se tornaram amigos além daquele ambiente. Especialmente à Mary Costa, que viveu comigo o início de minha vida acadêmica e se tornou uma amiga muito especial e querida.

A outros amigos que tanto me ajudaram. Ao Marcelo, que foi essencial no desenvolvimento deste trabalho e se tornou um amigo também. Vivi e Gabi da Santuza, que tantas vezes me salvaram quando precisei. Agradeço à Sabrina pelos anos de amizade. Meus amigos de graduação Maurício, Mateus, Caetano, Paulo, Leonardo que sempre me fizeram enxergar as coisas de outras formas e me relembram constantemente o valor das

amizades. Especialmente ao Vinícius, pela integridade, me mostrar meus erros, e que acompanhou todos os problemas que enfrentei e sempre esteve me apoiando.

Ao Pedro e ao José que me acompanham desde a infância e, cada um a seu jeito, me mostram outras formas de enxergar e ver as coisas. O Pedro com sua calma e forma completamente diferente de ver tudo, que me irrita às vezes, mas invariavelmente mostra que o limitado sou eu. Sem vocês muita coisa teria sido diferente.

Agradeço aos meus familiares, primos, tios e tias. Especialmente ao meu tio Renato, meu padrinho, por sempre ser alguém com quem posso contar e pelo carinho que sempre me tratou.

Às pessoas a quem devo tudo. Meu pai Domingos, minha mãe Rita e meu irmão Felipe. À minha madrinha Rosa. Por todo o sacrifício, apoio e suporte, eu nunca poderei agradecer o suficiente. Todos são os melhores exemplos que qualquer um poderia ter e agradeço imensamente a todos, em todos os sentidos e formas que houverem. Minha família é a base de onde eu consegui ser tudo o que já sou e ainda vou ser. De novo, e não sei como enfatizar isso mais: eu não poderia ter tido uma família melhor.

E agradeço à Isabela, a pessoa mais especial, inteligente e maravilhosa que já conheci. Minhas palavras com certeza serão desajeitadas e não conseguirão mostrar a emoção e o privilégio que sinto de poder contar com alguém tão fantástica quanto você. Todo o apoio, amor e carinho que recebo de você é algo indescritível. Felicidade só é de verdade se for compartilhada e tenho muita alegria de saber que posso ter você para compartilhar minha vida. Te agradeço por todo o amor e apoio, por inúmeras outras formas de enxergar as coisas que você me mostrou, por me ensinar que não adianta sofrer, por me ajudar, tanto com sua inteligência, quanto com seu companheirismo e principalmente por ser quem você é e me fazer uma pessoa infinitamente melhor.

Em uma de suas frases mais famosas, Isaac Newton disse “se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes”. Hoje eu entendo esta frase e reconheço cada um dos que me possibilitaram isso.

Agradeço, do fundo do meu coração, a todos!

“O começo de todas as ciências é o espanto das coisas serem o que são”

Aristóteles

“O que sabemos é uma gota. O que ignoramos um oceano.”

Sir Isaac Newton

Sumário

Resumo	I
Abstract	III
Lista de figuras	V
Lista de tabelas.....	VII
Lista de siglas e abreviaturas.....	VIII
1. Introdução	1
Capítulo 1	9
1. Introdução	10
1.1. Características do kDNA.....	10
1.1.1. Metabolismo do kDNA.....	12
1.1.2. Proteínas associadas ao cinetoplasto.....	13
1.2. Fontes de dano ao DNA	15
1.2.1. Radiação ultravioleta	16
1.2.2. Cisplatina.....	18
1.2.3. Estresse oxidativo	21
1.2.4. Mt-OX.....	23
1.3. Reparo de DNA	24
1.3.1. Reparo por excisão de bases	27
1.3.2. Reparo por excisão de nucleotídeos.....	32
1.3.3. Resposta ao dano no DNA	36
1.4. Vias de reparo do DNA mitocondrial.....	38
2. Objetivos	44
2.1. Objetivo geral	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3. Materiais e Métodos	45
3.1. Cultivo de células.....	45
3.2. Análise das sequências	45
3.3. Análise de potencial de membrana mitocondrial.....	45

3.4.	Tratamentos genotóxicos.....	46
3.4.1.	Tratamento com peróxido de hidrogênio.....	46
3.4.2.	Tratamento com Mt-OX	46
3.4.3.	Tratamento com metil metanossulfonato (MMS).....	46
3.4.4.	Tratamento com berenil.....	47
3.4.5.	Tratamento com radiação UV	47
3.4.6.	Tratamento com cisplatina.....	47
3.5.	Quantificação do número de danos ao DNA.....	48
3.5.1.	Extração de DNA.....	48
3.5.2.	Amplificação por qPCR e análise.....	49
3.5.3.	Quantificação do número de sítios AP no DNA total de <i>T. cruzi</i>	51
3.6.	Extração de proteínas e Western Blotting.....	51
3.7.	Imunofluorescência.....	52
3.8.	Ensaio de Anexina e Iodeto de propídeo	53
3.9.	Microscopia eletrônica de varredura	53
3.10.	Análise estatística	54
4.	Resultados	55
4.1.	TcMYH	55
4.1.1.	Análise da sequência.....	55
4.1.2.	Resposta ao estresse oxidativo	57
4.1.3.	Quantificação dos danos ao DNA.....	58
4.2.	TcKAP7	60
4.2.1.	Análise da sequência e confirmação dos mutantes	60
4.2.2.	Exposição ao MMS.....	63
4.2.3.	Exposição à berenil	66
4.2.4.	Exposição à peróxido de hidrogênio e ao reagente Mt-OX	68
4.2.5.	Exposição à cisplatina	70
4.2.6.	Exposição à radiação ultravioleta	71
4.2.7.	Análise de ciclo celular	75

4.2.8.	Cinética de reparo após tratamento com cisplatina e radiação UV	76
4.2.9.	Expressão de TcKAP7 após tratamento com cisplatina e radiação UV..	79
4.2.10.	Via de morte após tratamento com cisplatina e radiação UV	80
4.3.	AdKAP7	84
4.3.1.	Tratamento com cisplatina.....	84
4.3.2.	Formas aberrantes após tratamento com cisplatina.....	86
4.3.3.	Tratamento com radiação ultravioleta.....	87
4.3.4.	Cinética de reparo após tratamento com cisplatina e radiação UV	89
4.3.5.	Alterações de morfologia celular após tratamento com cisplatina e radiação UV	91
5.	Discussão	97
6.	Conclusões	123
Capítulo 2	124
1.	Introdução	125
1.1.	Variabilidade genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	125
1.2.	Recombinação e troca genética.....	127
2.	Objetivos	130
2.1.	Objetivo geral	130
2.2.	Objetivos específicos.....	130
3.	Materiais e Métodos	131
3.1.	Cultivo de células.....	131
3.2.	Incorporação de nucleotídeos.....	131
3.3.	Imunofluorescência.....	131
3.4.	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	132
3.5.	PCR em Tempo Real.....	133
4.	Resultados	135
4.1.	Crescimento após incorporação de análogos de timidina	135
4.2.	Cinética de formação de híbridos após incorporação de análogos de timidina	136
4.3.	Porcentagem de hibridização de cepas híbridas e não-híbridas	140

4.4. Porcentagem de hibridização de misturas de células híbridas e não-híbridas	142
4.5. Expressão de TcRad51 em cepas híbridas e não híbridas	143
5. Discussão	146
6. Conclusões	156
7. Referências Bibliográficas	157
8. Anexos	187
8.1. Anexo 1 – Imagens originais do <i>Western blotting</i> de extratos de <i>T. cruzi</i> após tratamento genotóxico	187
8.2. Anexo 2 – Curvas de crescimento dos ensaios usados nos ensaios de Anexina e iodeto de propídeo	188
8.3. Anexo 3 – Imagens representativas de campos observados nos ensaios de ADEXTa.....	189
8.4. Anexo 4 – Artigos científicos publicados durante o período de desenvolvimento da tese	190
1. Characterization of <i>Trypanosoma cruzi</i> MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response	190
2. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in <i>Trypanosoma cruzi</i>	190
3. Assessment of genetic mutation frequency induced by oxidative stress in <i>Trypanosoma cruzi</i>	190
4. The in vivo and in vitro roles of <i>Trypanosoma cruzi</i> Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions.....	190
5. Analysis of DNA Exchange Using Thymidine Analogs (ADEXTA) in <i>Trypanosoma cruzi</i>	191

Resumo

Trypanosoma cruzi é um membro da ordem Kinetoplastida e, como tal, possui uma mitocôndria única e modificada, chamada de cinetoplasto. O cinetoplasto possui diversas características únicas em comparação com a mitocôndria de outros eucariotos. Apesar de diversas proteínas de sistemas de reparo de DNA já terem sido descritas como presentes na mitocôndria destes parasitos, não existem muitas informações sobre as vias de reparo que estão envolvidas na manutenção do DNA do cinetoplasto (kDNA). Neste trabalho investigamos possíveis vias de reparo de DNA que podem estar envolvidas com o metabolismo do kDNA de *T. cruzi*. Estudamos o fenótipo de uma cepa superexpressora da proteína do reparo por excisão de bases TcMYH. Foi visto, por PCR quantitativa, que este superexpressor possui mais danos no kDNA no primeiro momento, em comparação com a cepa selvagem. Foi visto também, utilizando um reagente desenhado para causar danos especificamente no DNA mitocondrial, que este mutante é mais sensível que a célula selvagem e que esta superexpressão gera mais sítios AP no DNA total do parasito. Estes resultados sugerem que o parasita é capaz de lidar com dano oxidativo em seu kDNA. Uma das características únicas do cinetoplasto é a presença de proteínas específicas chamadas de proteínas associadas ao cinetoplasto (KAP). Apesar de alguns trabalhos descreverem a localização destas proteínas nos sítios antipodais, regiões na qual vários processos do metabolismo do kDNA ocorrem, suas funções não são claras ainda. Neste trabalho também estudamos a função da proteína TcKAP7, que possui homologia com o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM). Nossos resultados demonstraram que a falta de TcKAP7 está relacionada com a sensibilidade à radiação UV e cisplatina, além de resistência a altos níveis de estresse oxidativo no parasita. Este mesmo fenótipo de sensibilidade foi observado em heminocautes de um homólogo de TcKAP7 em outro tripanossomatídeo, o parasita de insetos *Angomonas deanei*. Nossos resultados demonstram que TcKAP7 está envolvida na resposta ao dano de DNA mitocondrial. Além de investigar os mecanismos de reparo do kDNA, neste trabalho também investigamos a troca de material genético em diferentes cepas de *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que *T. cruzi* é capaz de realizar troca

de material genético dentro de uma população e que, as diversas cepas distintas, são capazes de trocar material genético entre elas. Esta troca também parece estar diretamente ligada ao nível de TcRad51 nestas cepas. Estes resultados mostram que este parasita é capaz de trocar material genético e que a recombinação homóloga pode ter papel fundamental neste processo.

Abstract

Trypanosoma cruzi is a member of the Kinetoplastida and as so, present a single and unique mitochondria, called kinetoplast, which possesses several distinct features in comparison with other eukaryotes mitochondria. Although several proteins of the DNA repair systems have already being described as present on the parasite mitochondria, there's not much information about the DNA repair pathways involved on the kinetoplast DNA (kDNA) maintenance. In this work we investigate possible DNA repair pathways that could be involved on *T. cruzi* kDNA metabolism. To first investigate the repair proteins related to the kDNA metabolism we analyzed the effect of overexpressing the protein TcMYH, which is involved in base excision DNA repair in *T. cruzi*. As shown by qPCR, the overexpressor strain of TcMYH has more damages on the kDNA at the first moment, when compared to the wild type strain. Also, when we used a reagent designed to specifically cause damage on the mitochondrial DNA, we could observe that this mutant is more sensitive than the WT control strain, and that the overexpression of the protein generates more AP sites on the parasite organelle. These results suggest that the parasite is able to deal with oxidative damage that attacks the kDNA. One of the unique features of the kinetoplast is the presence of specific proteins called kinetoplast associated proteins (KAP). Although some works described the location of those proteins on the antipodal sites, regions of DNA metabolism on the kinetoplast, their function are not yet clear. In this work we study the function of the protein TcKAP7, which has sequence homology with the Mitochondrial transcription factor A (TFAM). Our results demonstrate that the absence of TcKAP7 is related to a long-term sensitivity to UV radiation and cisplatin; and a resistance to high levels oxidative stress on the parasite. The same phenotype has been observed for *Angomonas deanei* mutants, another trypanosomatid and an insect parasite. In this work we also investigate the genetic exchange events in different *T. cruzi* strains. Our results demonstrate that *T. cruzi* is able to perform genetic exchange among individuals in a same population. Also, the variety of *T. cruzi* strains are able to perform genetic exchange among them. This exchange is also linked to the levels of TcRad51 on these strains. Together, these results demonstrate that this parasite is able to

perform genetic exchange and that the homologous recombination could be linked to this process.

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1 - Morfologia básica da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 3 - Modificações no DNA causadas pela radiação UV	18
Figura 4 – Danos causados pela exposição do DNA à cisplatina.....	21
Figura 5 – Reações celulares em resposta ao estresse oxidativo causado pro peróxido de hidrogênio.....	23
Figura 6 - Fontes de dano ao DNA e principais vias de reparo.	25
Figura 7 - Reparo por excisão de bases	29
Figura 8 – 8-oxoguanina e Sistema GO	31
Figura 9 - Reparo por excisão de nucleotídeos.....	35
Figura 10 - Danos relacionados ao NER não são reparados em mitocôndrias de mamíferos.....	40
Figura 11 - Cinética de reparo de lesões no DNA nuclear e no DNA mitocondrial em <i>T. cruzi</i>	43
Figura 12 - Sequência de TcMYH e seus domínios	55
Figura 13 - Alinhamento de possíveis sequências de endereçamento em proteínas de <i>T. cruzi</i>	56
Figura 14 - Sobrevivência de TcMYH ao Mt-OX	57
Figura 15 Quantificação do número de sítios AP no DNA total da cepa TcMYH	58
Figura 16 – Quantificação no número de lesões após exposição à 100µM de peróxido de hidrogênio.....	60
Figura 17 - Alinhamento da proteína TcKAP7 em cepas distintas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	62
Figura 18 - Nocaute de TcKAP7	63
Figura 19 – Curva de crescimento após tratamento com 1,5mM de MMS.	65
Figura 20 – Sobrevivência de células TcKAP7KO e células selvagens após tratamento com MMS	65
Figura 21 - Curvas de crescimento após tratamento com doses diferentes de berenil	67
Figura 22 - Sobrevivência à peróxido de hidrogênio da cepa TcKAP7 KO.....	68
Figura 23 - Sobrevivência da cepa TcKAP7 KO ao Mt-OX	69
Figura 24 - Curva de crescimento de parasitos superexpressor, heminocaute e duplo nocaute na presença de cisplatina.....	70
Figura 25 – Sobrevivência após tratamento com cisplatina.....	71

Figura 26 - Curva de crescimento de parasitas heminocautes e duplo nocautes após exposição à diferentes doses de radiação UV.	72
Figura 27 - Exposição à radiação UV após pré-tratamento com inibidores de sinalização	74
Figura 28 – Análise de ciclo celular após irradiação ultravioleta	76
Figura 29- Cinética do reparo de lesões causadas por 300µM de cisplatina.....	77
Figura 30 - Cinética do reparo de lesões causadas por 1500µJ/cm ² de radiação UV	78
Figura 31 - <i>Western blot</i> de TcKAP7 em células selvagem após tratamento com agentes genotóxicos.	80
Figura 32 - Ensaio de anexina V e iodeto de propídeo após exposição à radiação UV	82
Figura 33 - Ensaio de anexina V e iodeto de propídeo após exposição à cisplatina ...	83
Figura 34 - Resposta de AdKAP7 +/- ao tratamento com cisplatina.....	85
Figura 35 - Porcentagem de células com simbionte filamentado	87
Figura 36 - Resposta à radiação ultravioleta	88
Figura 37 - Cinética do reparo de lesões causadas por 300µM de cisplatina.....	90
Figura 38 - Cinética do reparo de lesões causadas por 1500µJ/cm ² de radiação UV	91
Figura 39 - Ultraestrutura do kDNA de células selvagem e mutantes para AdKpa7 ...	93
Figura 40 – MEV de Protozoários <i>Angomonas deanei</i> selvagem (WT) e mutantes para AdKAP7 após tratamento com cisplatina	94
Figura 41 – MEV de células selvagem irradiadas com 1500µJ/cm ² de radiação UV ...	95
Figura 42 - MEV de células heminocautes para AdKAP7 irradiadas com 1500µJ/cm ² de radiação UV.....	97
Figura 43 – Proteínas envolvidas na resposta à 8-oxoguanina já descritas no cinetoplasto de <i>T. cruzi</i>	104

Capítulo 2

Figura 1 - Relações filogenéticas entre as linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i>	126
Figura 2 – Curva de crescimento após incorporação de análogos.....	136
Figura 3 - Cinética de hibridização nas primeiras 24 horas após incorporação de análogos de timidina	138
Figura 4 - Cinética de hibridização 48 horas após incorporação de análogos de timidina	139
Figura 5 - Deconvolução do eixo Z de uma célula híbrida.....	140
Figura 6 - Níveis de hibridização de cepas distintas de <i>T. cruzi</i>	141
Figura 7 – Níveis de hibridização de misturas de cepas distintas	143
Figura 8 – Níveis de TcRad51 de cepas distintas de <i>T. cruzi</i>	145

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 - Lista de iniciadores para <i>T. cruzi</i> utilizados no trabalho	49
Tabela 2 - Programas utilizados para amplificação dos fragmentos longos e curtos para a qPCR.....	50
Tabela 3 – Valores de sobrevivência das células pré-tratadas ou não com inibidor de ATM, ATR ou cafeína e expostas à radiação ultravioleta.....	74
Tabela 4 - Porcentagem de sobrevivência após irradiação com radiação UV em células pré-tratadas com cafeína ou tratadas após irradiação UV	89

Capítulo 2

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a PCR em Tempo Real	134
--	-----

Lista de siglas e abreviaturas

6,4PP	fotoprodutos 6-4 (6-4 photoproducts)
8-oxoG	8-oxoguanina
AP	Apurínico\Apirimidínico
ADExTA	<i>Analysis of DNA Exchange by Thymidine Analogs</i>
BER	Reparo por excisão de bases (Base excision repair)
CPD	Dímero de pirimidina ciclobutano (Cyclobutane pyrimidine dimer)
CSA	Cockayne Syndrome A
CSB	Cockayne Syndrome B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GG-NER	Reparo do global do genoma (Subvia do NER)
HRR	Reparo por recombinação homóloga (Homologous Recombination Repair)
KAP	Proteína associada ao cinetoplasto (Kinetoplast associated protein)
Kb	Kilobase
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver infusion-tryptone</i>
MMS	Metilmetano sulfonato
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidine
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos (Nucleotide excision repair)
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas (Non Homologous End Joining)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (Polymerase chain reaction)
PoIβ	Polimerase Beta
PoIβ-PAK	Polimerase BETA-PAK
PoIκ	Polimerase Kappa
qPCR	PCR quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (Reactive nitrogen species)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Reactive oxygen species)
TC-NER	Reparo acoplado à transcrição (Subvia do NER)
TLS	Síntese translesão (Translesion synthesis)
UV	Ultravioleta
XP (A-G)	<i>Xeroderma pigmentosum</i> - Grupos de complementação A, B, C, D, E, F, G, V

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (NTD do inglês *Neglected tropical diseases*) fazem parte de uma categoria cuja nomenclatura surgiu nos anos 2000, englobando doenças que afetam populações de diversas partes do mundo, mas com origem em regiões tropicais e em países do terceiro mundo (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) categoriza as NTD's como um grupo de doenças presentes em 149 países no mundo, afetando cerca de um bilhão de pessoas no total (a maioria de regiões de pobreza) e com ações de controle principalmente locais e voltadas para controle de vetores, saneamento básico e prevenção de infecções (WHO, 2014).

Dentre as 19 principais doenças desta classe estão doenças parasitárias causadas por membros da família Kinetoplastida, como *Trypanosoma cruzi*, parasito causador da doença de Chagas (ou tripanossomíase americana) que, estima-se, afeta oito milhões de pessoas diretamente e expõe outras 25 milhões de pessoas ao risco de infecção (WHO, 2014). Apenas na América Latina a doença é responsável pela morte de cerca de 14 mil pessoas por ano (HOTEZ *et al.*, 2012) e possui uma variedade de sintomas relacionados com o sítio de colonização do parasito, a cepa associada à infecção, a resposta imune do hospedeiro, dentre outros fatores ainda sendo estudados, como a alta variabilidade genética dentre grupos distintos do parasito (ANDRADE *et al.*, 2002; BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003; KAYAMA; TAKEDA, 2010).

Os membros da ordem Kinetoplastida, da qual *T. cruzi* faz parte, são caracterizados principalmente por conterem uma mitocôndria única e alongada (Figura 1) que percorre o corpo celular do parasito e contém uma região, na qual se encontram as cópias do DNA mitocondrial do organismo, denominada cinetoplasto. O DNA mitocondrial é formado por uma rede de anéis concatenados chamados de minicírculos e maxicírculos (SIMPSON *et al.*, 1980), denominado kDNA, e é localizado próximo ao corpo basal do flagelo dos tripanossomatídeos. O flagelo, por sua vez, se localiza na bolsa flagelar, de onde ele pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário vá

assumir (BRISSE *et al.*, 2003). Mais detalhes sobre o DNA mitocondrial serão discutidos posteriormente.

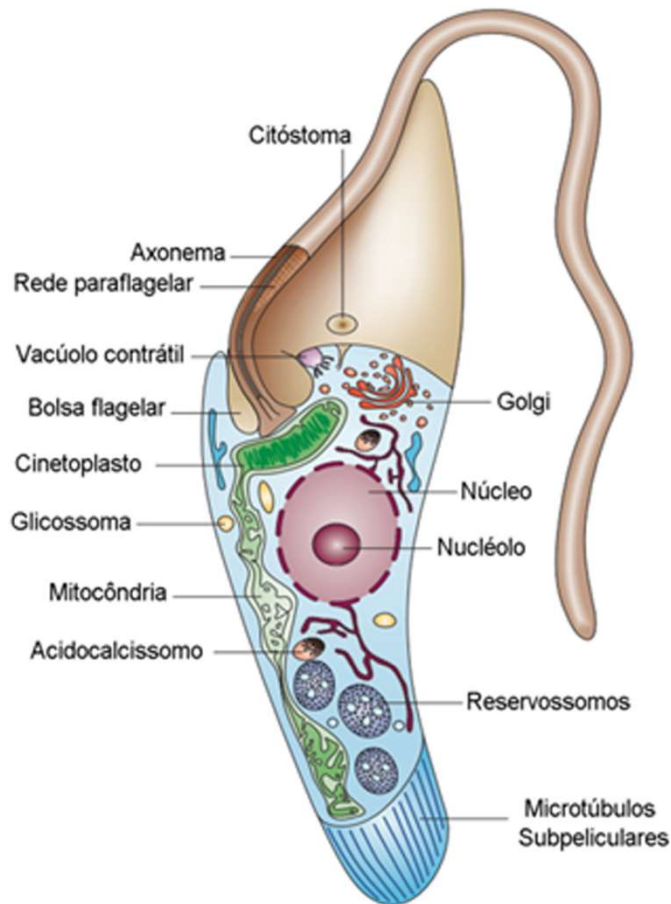


Figura 1 - Morfologia básica da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* - Representação esquemática da forma não infectiva epimastigota de *T. cruzi*, destacando as principais estruturas celulares como a mitocôndria única e alongada percorrendo o corpo celular do parasito, o cinetoplasto, a bolsa flagelar e o núcleo (Adaptado de DoCampo, 2005)

O *Trypanosoma cruzi*, descrito como agente etiológico da doença de Chagas é um parasita protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida que inclui, além do gênero *Trypanosoma*, também o gênero *Leishmania*. Os tripanossomatídeos divergiram evolutivamente entre 200 milhões e 500 milhões de anos atrás, colocando este grupo entre a emergência dos artrópodes e dos mamíferos (DA SILVA, MARCELO S. *et al.*, 2017). Esta posição evolutiva faz com que estes organismos possuam diversas características únicas em eucariotos, como a transcrição

policistrônica (TEIXEIRA, S. M.R., 1998), a edição de RNA's (RAMÍREZ, CÉSAR; PUERTA; REQUENA, 2011), dentre outras.

A alta variabilidade genética entre os membros da espécie levou à classificação do parasito em unidades taxonômicas distintas (DTU do inglês *discrete taxonomic unit*), dividindo o parasito em seis grupos, hoje nomeados de T. cruzi I à T. cruzi VI, levando-se em conta características como a disposição geográfica, marcadores moleculares e características genotípicas dos parasitos (BAPTISTA *et al.*, 2014; ZINGALES, BIANCA *et al.*, 2012). Esta variabilidade genética se reflete em diferenças fenotípicas entre as cepas, como resistência alterada a determinados agentes citotóxicos e genotóxicos (GRYNBERG *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2014) e diferentes ativações de resposta imune de seus hospedeiros (KAYAMA; TAKEDA, 2010).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* é complexo, envolvendo dois hospedeiros e uma forma intracelular replicativa obrigatória (Figura 2). Em cada um destes hospedeiros e fases de desenvolvimento o parasito assume uma diferente morfologia. A infecção se inicia no momento do repasto sanguíneo pelo hospedeiro invertebrado que no ambiente natural pode ser um dos mais de 130 hemípteros da família Reduviidae. Durante este processo, o inseto vetor defeca próximo ao local da ferida. Estas fezes contaminadas com a forma tripomastigota do parasito, quando atingem a corrente sanguínea, infectam as células do hospedeiro vertebrado. Dentro destas células, o parasito se diferencia para sua forma amastigota replicativa que se divide por divisão binária. Após vários ciclos de replicação, o parasito volta a se diferenciar na forma tripomastigota e a célula hospedeira é destruída, liberando-os na corrente sanguínea. Neste momento ocorre um ciclo de reinfecção, aumentando a quantidade de parasitos no hospedeiro, resultando em alguns dos sintomas clínicos da doença. Outro inseto vetor que se alimentar do sangue deste hospedeiro vertebrado infectado adquire esta forma tripomastigota sanguínea e, no trato digestivo deste inseto, estas células se diferenciam em sua forma epimastigota replicativa. Após a replicação, o parasito novamente se diferencia na forma infectiva tripomastigota metacíclica que ao ser eliminada nas fezes, durante o próximo repasto, podem iniciar o novo ciclo de infecção (BRENER, 1973; PRATA, 2001). O homem é um hospedeiro acidental do *Trypanosoma cruzi*, resultado da retirada do inseto vetor de seu

ciclo silvestre habitual. A sua infecção se dá, principalmente, pelo contato com fezes infectadas de hemípteros da subfamília Triatominae durante a sua alimentação. Além disso, a infecção também pode ocorrer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, infecção congênita, acidentes em laboratórios e alimentos contaminados (PRATA, 2001).

O tratamento da Doença de Chagas, comumente feito com as drogas Benzonidazol, ou BZ, (N-benzyl-2-nitro-imidazole-1-acetamida) e Nifurtimox (4[(5-nitrofurfurylidene)amino]-3-methylthiomophorline-1,1-dioxide) é dispendioso e envolve vários efeitos colaterais para o paciente, além de existirem cepas com diferentes susceptibilidades a estas drogas, possuindo uma proporção de cura de aproximadamente apenas 5% a 20% (CANÇADO, 2002). Já foram também reportados relatos de resistência, natural ou adquirida, ao tratamento, juntamente com os mecanismos que poderiam fazer esta resistência surgir em populações de *T. cruzi* (FILARDI; BRENER, 1987; MEJIA *et al.*, 2012). Vários estudos tentam desvendar mecanismos ou possíveis drogas para o tratamento, partindo de funções de proteínas essenciais à sobrevivência do parasito ou proteínas específicas da mitocôndria (SILVA PAES *et al.*, 2011), como abordagens de bioinformática buscando inibidores específicos (BELLERA *et al.*, 2013). O metabolismo de DNA já foi demonstrado como alvo para o mecanismo de ação do benzonidazol (RAJÃO *et al.*, 2014) e alguns trabalhos tentam estudar aspectos únicos do metabolismo de DNA do parasito, visando minimizar a toxicidade do tratamento para o paciente (ZUMA *et al.*, 2011). Dessa forma, compreender o metabolismo de DNA em *T. cruzi* poderia elucidar os mecanismos envolvendo a biologia do parasito e permitir potenciais novas vias de tratamento para a doença.

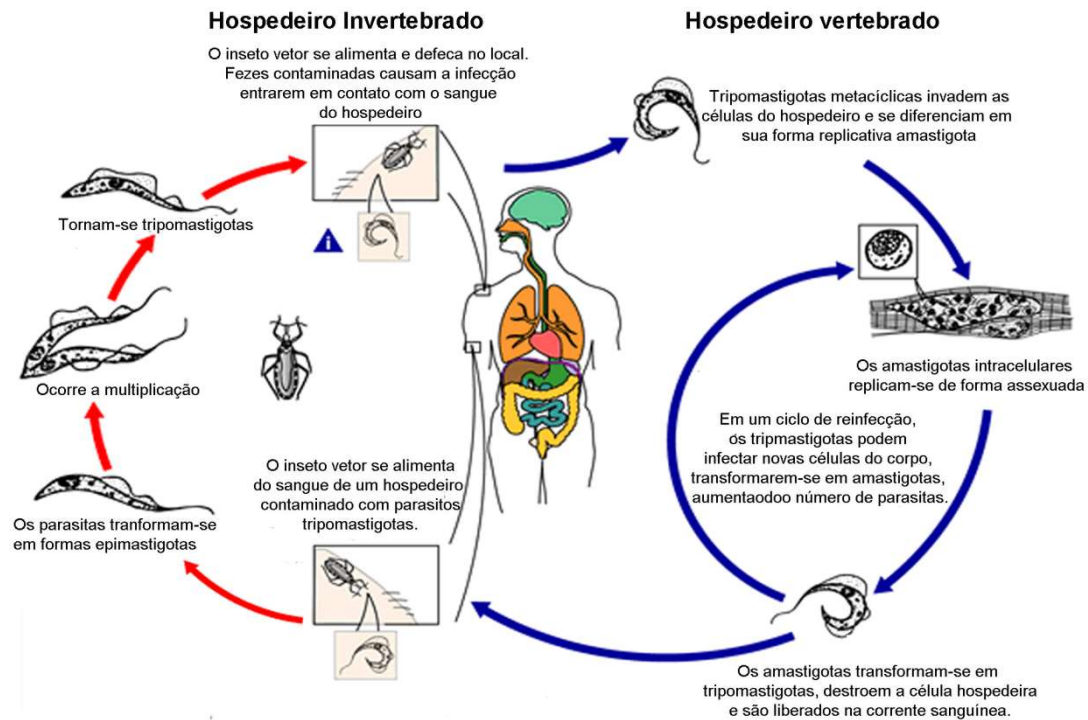


Figura 2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* - O esquema representa o ciclo de vida do parasito, destacando suas formas (tripomastigota metacíclica, amastigota intracelular, epimastigota e tripomastigota) bem como os hospedeiros vertebrado e invertebrado que fazem parte do ciclo de vida do parasito. (Figura adaptada de CDC – Center for Disease Control, disponível em www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html)

Além dos tripanossomatídeos causadores de doença, como *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania spp.*, existem também membros do grupo *Trypanosomatida* que são parasitos de insetos e que não causam doenças em mamíferos. Uma destas espécies é o parasito de insetos *Angomonas deanei*. Dentre as várias características únicas deste organismos, uma das mais interessantes é a presença de uma bactéria endossimbiótica em seu interior, o que faz com que este parasito possua 3 genomas: o genoma nuclear, o genoma do cinetoplasto e o genoma do endossimbionte (HARMER *et al.*, 2018).

Desde que foi proposta a teoria da endossimbiose, a influência do processo na evolução dos eucariotos levantou diversas questões. A associação entre bactérias e eucariotos já foi descrita em diversos grupos dos dois principais domínios da vida e em diversos estágios distintos do processo de assimilação e integração do metabolismo entre o hospedeiro e sua bactéria (NOWACK;

GROSSMAN, 2015). Neste processo de integração, geralmente o genoma bacteriano se reduz com a perda de genes que não são essenciais ao seu hospedeiro, criando uma dependência da bactéria de seu hospedeiro (MCCUTCHEON; MORAN, 2012; MOYA *et al.*, 2008). Os mecanismos moleculares que coordenam este processo, porém, estão começando a ser elucidados. Muitas questões acerca de como ocorre a perda do material genético; como ocorre a troca de moléculas durante o processo de endossimbiose; qual o sinal faz com que a célula não combata a bactéria, mas sim faça uma relação simbiótica com a mesma; como ocorre a coordenação do ciclo celular entre os dois organismos; dentre outras, ainda estão em aberto.

Os membros do grupo Kinetoplastida apresentam alguns organismos que possuem endossimbiontes. Membros dos gêneros *Angomonas*, *Strigomonas* e *Kentomonas* são organismos que possuem uma associação simbiótica com uma única β -proteobactéria em seu citoplasma (ALVES, JOÃO M.P. *et al.*, 2013) e este processo de endossimbiose em tripanossomatídeos parece ter uma origem monofilética (ALVES, JOÃO M.P. *et al.*, 2013; HOLLAR; LUKEŠ; MASLOV, 1998). Estudos utilizando a subunidade menor do DNA ribossomal demonstraram que, provavelmente, os simbiontes destes grupos têm origem na β -proteobactéria do gênero *Bordetella* (DU; MASLOV; CHANG, 1994; HOLLAR; LUKEŠ; MASLOV, 1998; TEIXEIRA, MARTA M.G. *et al.*, 2011). De fato, além destes gêneros, apenas a espécie *Novyomonas esmeraldas*, outra espécie de tripanossomatídeo, adquiriu também um endossimbionte, mas em um processo que, até o momento, é considerado como um evento independente dos demais (KOSTYGOV *et al.*, 2016).

Em *Angomonas deanei*, tripanossomatídeo parasito de insetos que antes era denominado *Crithidia deanei* (TEIXEIRA, MARTA M.G. *et al.*, 2011), o simbionte apresenta um envelope composto por duas membranas e uma parede de peptidoglicanos presente, ainda que reduzida (MOTTA, MARIA CRISTINA M. *et al.*, 1997). Com as novas tecnologias de sequenciamento, o genoma de ambos, parasito e simbionte, foram elucidados e foi demonstrado que o endossimbionte tem um genoma de 0.8Mb, reduzido em comparação com β -proteobactéria de vida livre (ALVES, JOÃO M.P. *et al.*, 2013; MOTTA, MARIA CRISTINA MACHADO *et al.*, 2010). A análise do genoma dos dois revelou que

o simbiote é capaz de complementar vias essenciais de síntese de *A. deanei*, como a produção de heme (ALVES, JOÃO M.P. *et al.*, 2011), aminoácidos (ALVES, JOÃO M.P. *et al.*, 2013), vitaminas e bases nitrogenadas (KLEIN *et al.*, 2013; MOTTA, MARIA CRISTINA MACHADO *et al.*, 2013).

Nesta interação entre *A. deanei* e seu endossimbiote, um fato marcante é o controle da divisão celular sincronizado entre os dois. Ao contrário de *T. brucei* e outros tripanossomatídeos nos quais a primeira organela a se dividir é o cinetoplasto (HAMMARTON, 2007), a divisão de *A. deanei* começa quando seu simbiote se alonga e permanece próximo ao núcleo do parasito, onde ocorre sua divisão. Após isso, o simbiote migra para a porção posterior da célula e ocorre a replicação do cinetoplasto e do flagelo. Somente então o núcleo também se divide e a célula é capaz de terminar seu ciclo (MOTTA, MARIA CRISTINA MACHADO *et al.*, 2010). Um aspecto interessante no estudo com *A. deanei* é o fato de que problemas no genoma e na replicação são refletidos em seu simbiote. Tratamentos com agentes genotóxicos, como camptotecina e afidicolina, ou com agentes que inibem a síntese proteica como a cicloheximida, levam à filamentação do simbiote (CATTAPRETA *et al.*, 2015). Este fenótipo claro permite que seja fácil a detecção de problemas de replicação e no metabolismo de DNA neste parasito.

Os resultados deste trabalho foram divididos em dois capítulos. No primeiro capítulo são apresentados os resultados e discussão acerca das investigações sobre vias de reparo mitocondrial que poderiam estar associados com a manutenção do DNA do cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* e *Angomonas deanei*. Fomos capazes de identificar genes relacionados com o metabolismo do DNA mitocondrial após tratamentos com diversos agentes genotóxicos e demonstramos que estes parasitas possuem características únicas com relação ao metabolismo do genoma mitocondrial após tratamento com agentes genotóxicos.

No segundo capítulo, apresentaremos os resultados obtidos sobre o processo de recombinação e troca de material genético em *T. cruzi*. Apesar de existirem evidências evolutivas de que a recombinação teve um papel fundamental na filogenia das diversas cepas deste parasito, a demonstração de

eventos de troca genética em condições laboratoriais e a extensão da influência deste processo para o parasito ainda é alvo de muita discussão e dúvidas. Mostramos que *T. cruzi* é capaz de realizar trocas genéticas entre indivíduos de populações distintas e que este processo está diretamente relacionado com a recombinação homóloga.

Capítulo 1

Vias de reparo do DNA mitocondrial

1. Introdução

1.1. Características do kDNA

Assim como todos os demais membros da ordem Kinetoplastidae, *Trypanosoma cruzi* também apresenta uma mitocôndria grande e única como já foi destacado. Esta mitocôndria, denominada cinetoplasto, possui um DNA próprio chamado de kDNA. Este kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares dispostas sob a forma de anéis concatenados: o minicírculo e o maxicírculo. Em organismos relacionados à *T. cruzi*, como *Chtridia fasciculata*, esta rede possui cerca de 5.000 minicírculos e 64 maxicírculos, porém o tamanho e o número de moléculas que constituem o kDNA é variado entre os organismos (JENSEN; ENGLUND, 2012). Estudos sobre o metabolismo do kDNA foram pioneiros em descrever processos de funções importantes pro metabolismo dos mais diversos organismos: foi em *Trypanosoma brucei* que a edição de RNA em eucariotos foi descrita primariamente; também em *T. brucei*, estudos sobre o complexo 1 da cadeia respiratória foram cruciais para a descrição da variedade existente em humanos; em *T. cruzi* a descrição de canais transportadores de cálcio levou à descoberta de homólogos em outros organismos (VERNER *et al.*, 2015).

A muito já se conhece a estrutura única desta organela (RIOU; DELAIN, 1969; SHAPIRO; ENGLUND, 1995), porém os mecanismos moleculares que são consequência desta estrutura estão, aos poucos, sendo elucidados. O kDNA consiste de uma associação dos maxicírculos, em números variados entre os organismo, mas *T. brucei* possui 12 moléculas de DNA contendo 18 genes codificantes de proteínas, mais dois RNA's com códons de parada prematuros, com milhares de moléculas de minicírculos (READ; LUKEŠ; HASHIMI, 2016). Também está presente, na porção final do cinetoplasto e próximo ao ponto de inserção do flagelo, os sítios antipodais: locais de metabolismo de DNA nos quais ocorre a aglomeração do kDNA. Nestes sítios antipodais é descrito que ocorre a replicação do kDNA e, por isso, estes locais são utilizados como pontos de marcação de localização mitocondrial para proteínas (JENSEN; ENGLUND, 2012).

A função dos minicírculos consiste em codificar RNA's guia para o processo de edição. A importância da necessidade de se manter tanto os maxicírculos quanto os minicírculos fica evidente em *T. brucei*, no qual a perda de alguma das classes de minicírculos leva à uma perda da viabilidade celular (BORST, 1991). Mesmo parasitos que não possuem essa rede de anéis concatenados, existem mecanismos para manter estas classes ou estrutura semelhantes. O parasita de peixes, *Trypanosoma borreli*, não possui o kDNA formado em anéis concatenados (e sim uma estrutura denominada mega-kDNA, caracterizado por um anel denso de DNA em seu cinetoplasto), porém possui sequências semelhantes à minicírculos inseridas em tandem em moléculas de DNA circular (LUKES *et al.*, 2002).

A história evolutiva desta organela única ainda necessita de mais estudos, porém é descrito e aceito que a estrutura do kDNA de *Cryptobia helicis* (chamada de pan-kDNA, que apresenta minicírculos dispostos em monômeros, de forma semelhante à organização de plasmídeos e maxicírculos superenovelados) seria a forma ancestral de estrutura do kDNA. Desta organização teria havido uma separação entre aqueles que apresentam anéis concatenados (como *T. cruzi* e *T. brucei*) e os que apresentam a estrutura de mega-kDNA (como *T. borreli*). A perda deste superenovelamento levou à compactação dos minicírculos e organização destes nos *foci* onde são necessários para outros processos, como a edição de RNA (explicado mais adiante). Esta compactação levaria à organização em disco e ao aumento da complexidade desta estrutura com a agregação de mais cópias destas moléculas pequenas de DNA (LUKES *et al.*, 2002).

Já foram descritos alguns processos do metabolismo de tripanossomatídeos que envolvem o cinetoplasto, como a replicação (SHAPIRO; ENGLUND, 1995) e a edição de RNA (ALFONZO; THIEMANN; SIMPSON, 1997; STURM; SIMPSON, 1990), porém, apesar de alguns trabalhos descrevendo localização de proteínas que atuam no reparo de DNA ainda não se possui evidências de quais vias desse processo que atuam na manutenção do kDNA.

1.1.1. Metabolismo do kDNA

Os tripanossomatídeos possuem processos únicos de metabolismo devido à organização e estrutura de seu kDNA. A edição de RNA, por exemplo, é um processo presente em vários organismos eucariotos. Primeiramente demonstrado em *Trypanosoma brucei*, o processo foi descrito como sendo a inserção ou deleção de uridinas da molécula de RNA mensageiro do gene da citocromo c oxidase 2 (Cox2). Este processo levaria à uma alteração do *frameshift* do gene, levando à correção da transcrição e posterior expressão do mesmo (BENNE *et al.*, 1986). O mecanismo exato pelo qual as possíveis edições de RNA ocorrem estão sendo estudados, porém, em tripanossomatídeos, está intrinsecamente ligado com a estrutura de seu kDNA. De todos os transcritos presentes no maxicírculo de *T. brucei*, 12 necessitam a inserção ou deleção de uridinas para gerarem mRNA's funcionais, sendo que alguns deles necessitam da inserção de várias uridinas em sequência para serem corretamente traduzidos (READ; LUKEŠ; HASHIMI, 2016).

Para lidar com os anéis concatenados dos minicírculos e maxicírculos, os tripanossomatídeos criaram mecanismos para garantir a replicação fiel e a segregação correta das moléculas filhas, já que durante a fase S da mitocôndria a rede do kDNA dobra seu tamanho e volume para que cada organela filha receba uma cópia de cada molécula. Dois mecanismos principais são propostos na literatura científica. O mecanismo em anel (usado por *T. cruzi* e *Leishmania major*) no qual o disco de kDNA gira em relação ao sítios antipodais; e o mecanismo polar (usado por *T. brucei*), no qual os sítios antipodais permanecem fixos (JENSEN; ENGLUND, 2012). No mecanismo de anel, os sítios antipodais flanqueiam o disco do kDNA e o sistema se movimenta de forma circular. A cada turno, o mecanismo continua sintetizando a próxima molécula de DNA em uma espiral. O movimento relativo entre o disco do kDNA e os sítios antipodais que é responsável pelo progresso da replicação. Os detalhes do mecanismo (como quais proteínas são necessárias, se os sítios antipodais que se movimentam ou o kDNA que se movimenta) ainda não foram elucidados (JENSEN; ENGLUND, 2012; LIU, BEIYU *et al.*, 2005).

Ao contrário do mecanismo em anel, o mecanismo polar já é mais compreendido. Inicialmente, minicírculos que são fechados covalentemente

iniciam o processo de replicação (ainda não se sabem os detalhes sobre o início deste processo). Neste processo ocorre a migração de algumas das moléculas do minicírculo para os sítios antipodais e, enquanto a replicação continua, ocorre o acúmulo destas moléculas recém-sintetizadas nas zonas polares, acarretando no alongamento da rede de kDNA. Com a continuidade do processo, ocorre a diminuição da largura da região central, até o ponto em que todas as moléculas dos minicírculos e maxicírculos estão replicadas. Ao final da replicação e segregação, em um processo possivelmente catalisado pela proteína Topo II, as redes irmãs se remodelam e os maxicírculos se tornam corretamente distribuídos entre os dois cinetoplastos (JENSEN; ENGLUND, 2012).

1.1.2. Proteínas associadas ao cinetoplasto

As proteínas associadas ao cinetoplasto (KAP, do inglês *Kinetoplast Associated Protein*) são proteínas geralmente pequenas, de 15 à 27kDa, com características básicas e conteúdo elevado de arginina e lisina (MORINI, 2015). A identificação destas proteínas foi feita inicialmente no cinetoplasto do tripanossomatídeo *Crithidia fasciculata*. Foram identificadas cinco destas proteínas KAP em *C. fasciculata*, que foram denominadas CfKAP1 à CfKAP5 (XU *et al.*, 1996). Apesar de ainda não ser claro, é sugerido que os nove primeiros aminoácidos da sequência destas KAPs está associada com a importação destas proteínas para o cinetoplasto deste parasito (HINES; RAY, 1997; XU *et al.*, 1996), porém estes mesmos aminoácidos não estão presentes em todas as proteínas KAPS de outros organismos.

A função destas proteínas ainda não é bem elucidada, e algumas parecem estar envolvidas com o metabolismo do kDNA. O nocaute de CfKAP1 levou à desorganização da rede de seu kDNA (LUKEŠ *et al.*, 2001), ao passo que o nocaute de CfKAP2 e CfKAP3 acabaram causando problemas de replicação, redução na taxa de consumo de oxigênio e um aumento na expressão de genes do maxicírculo do parasito (AVLIYAKULOV; LUKEŠ; RAY, 2004) indicando que elas estão envolvidas com mais de um processo do metabolismo do kDNA.

Um dos trabalhos mais recentes a respeito destas proteínas foi feito em *T. brucei*, com a caracterização da proteína TbKAP6. Assim como todas as outras proteínas desta família, foi mostrado que esta proteína também está

associada exclusivamente ao cinetoplasto e que a diminuição dos níveis de sua expressão por RNAi levam à perda do cinetoplasto (WANG, JIANYANG *et al.*, 2014), fenótipo semelhante ao observado em tratamentos com berenil em algumas células (ZUMA *et al.*, 2014). Esta perda do cinetoplasto é também acompanhada pela desorganização do mesmo e encolhimento aparente do disco de kDNA, junto de problemas de replicação dos minicírculos e maxicírculos. Um ponto interessante apontado neste estudo é que, assim como a depleção levou à estes fenótipos, a superexpressão desta mesma proteína também causou fenótipos claros de problemas na replicação do kDNA do parasito (WANG, JIANYANG *et al.*, 2014). Até o momento esta é a proteína associada ao cinetoplasto mais bem caracterizada.

Em *T. cruzi* poucos trabalhos endereçaram a função destas proteínas associadas ao cinetoplasto. Já foram descritas as proteínas TcKAP4, TcKAP6 e TcKAP3 neste parasito. Foi demonstrado que TcKAP4 e TcKAP6 se localizam no disco de kDNA destes parasitos, mas sua localização é dependente do da fase do ciclo celular de *T. cruzi* (CAVALCANTI *et al.*, 2009). Também já foi descrito os efeitos do nocaute de TcKAP3 no parasito. A depleção de TcKAP3 não alterou a proliferação, diferenciação ou infectividade do parasito, nem mesmo na estrutura do kDNA e na estrutura celular (SOUZA, FLAVIA SÁ PEREIRA DE *et al.*, 2010). Todos estes resultados levaram à sugestão de que talvez as funções das proteínas associadas ao cinetoplasto sejam diversas, atuando desde o controle transcricional de proteínas mitocondriais até o arranjo estrutural do kDNA. A falta de fenótipo observável em alguns destes nocautes, como TcKAP3 é uma sugestão de que elas possam ser essenciais aos organismos e terem, portanto, funções redundantes dentro da célula.

T. cruzi apresenta, até o momento, seis possíveis proteínas KAP, quando foram buscadas com base na similaridade com as sequências de *C. fasciculata* (CAVALCANTI 2009). Este conjunto de proteínas exclusivas do cinetoplasto, com funções já descritas relacionadas ao metabolismo do kDNA nos levou a ter interesse no estudo funcional destas proteínas. Como dito anteriormente, estes organismos possuem apenas uma mitocôndria e uma organização única de seu DNA mitocondrial, ainda que com um número variável de cópias (JENSEN; ENGLUND, 2012). Desta forma, estudar as funções destas proteínas KAP pode

elucidar pontos do metabolismo do DNA de *T. cruzi*. Neste trabalho estudamos os efeitos do nocaute de TcKAP7.

1.2. Fontes de dano ao DNA

Além da replicação, o reparo é uma das vias de metabolismo de DNA essenciais a todos os organismos, que estão continuamente sendo expostos à agentes causadores de danos ao DNA (Figura 3). A estrutura primária do DNA pode sofrer com a ação de diversos fatores físicos e moléculas que estão presentes no ambiente celular normal. Já foi descrito, por exemplo, que podem ser perdidos por dia, aproximadamente 18.000 resíduos de purina, devido ao processo de hidrólise da ligação entre a base nitrogenada e o esqueleto de fosfato do DNA (LINDAHL; NYBERG, 1972).

As fontes de danos endógenos ao DNA são aquelas decorrentes geralmente de processos de hidrólise e reações de oxidação causada por metabólitos comuns ao ambiente interno celular (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Dentre as principais modificações e lesões resultantes desse tipo de dano temos as alterações espontâneas (como a desaminação da citosina em uracila, a desaminação da 5-metilcitosina em timina e também, apesar de mais raras, a desaminação de guanina e adenina) e alterações como metilações e oxidações de bases que são dependentes da ação de agentes metilantes ou oxidantes (FRIEDBERG *et al.*, 2006; MARNETT; PLASTARAS, 2001).

Dentre as fontes físicas externas de dano ao DNA podemos citar a radiação ionizante e ultravioleta, ambas com potencial citotóxico e mutagênico (HOEIJMAKERS, 2001). A radiação ionizante espacial, por exemplo, é capaz de transferir energia e causar modificações em biomoléculas que podem ser nocivas à saúde dos organismos. A medida em que cada organismo é susceptível à um tipo de agente genotóxico é bem ampla: células humanas em cultura podem sentir os efeitos da radiação ionizante em doses tão pequenas quanto 4Gy (YONETANI *et al.*, 2005), enquanto alguns organismos resistem a doses mais de 100 vezes superiores (LIU, YONGQING *et al.*, 2003). É bom ressaltar que as fontes de danos ao DNA são capazes de causar mais de um tipo de dano (embora as mais estudadas causem uma proporção maior de

apenas uma modificação no DNA). A própria radiação ionizante, por exemplo, é capaz de gerar dano oxidativo dependendo da fonte radioativa utilizada.

1.2.1. Radiação ultravioleta

Historicamente a radiação ultravioleta (UV) possui um papel central dos estudos sobre o metabolismo de DNA e da via de reparo por excisão de nucleotídeos, marcando o início dos estudos de reparo de DNA e, ao lado do estresse oxidativo, é uma das fontes de dano ao DNA mais relevantes para os organismos (FRIEDBERG *et al.*, 2006). A radiação UV é subdividida em três espectros, de acordo com seu comprimento de onda. A radiação denominada UV-A cobre dos comprimentos de onda de 320nm a 400nm; a radiação UV-B de 295nm a 320nm; e a radiação UV-C de 100nm a 295nm, sendo esta a mais relevante na literatura pois cobre o pico de absorção de radiação do DNA que é de 260nm (MITCHELL; JEN; CLEAVER, 1991). Assim como qualquer radiação, ela é capaz de causar alterações em todas as moléculas do organismo, e a luz solar é especialmente rica em radiação do espectro UV-A e UV-B. A capacidade destes dois tipos de radiação UV de serem absorvidos por compostos aromáticos e cíclicos, além da contínua exposição dos organismos à este tipo de radiação, fazem dela uma importante fonte de ambiental de mutagênese (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

A exposição do DNA a UV-C leva à formação de fotoprodutos a partir da ligação covalente entre pirimidinas adjacentes. Dentre os fotoprodutos gerados pela radiação UV estão as lesões fotoinduzidas capazes de alterar a ligação de purinas (como dímero 8,8 de adenina), a timina glicol, os hidratos de pirimidina (adição de moléculas de água à citosinas e timinas presentes no DNA e no pool de nucleotídeos), os dímeros de ciclobutano (CPD) e o fotoproducto 6-4 (6-4 PP, também chamado de fotoproducto pirimidina-pirimidona 6-4) (MITCHELL; JEN; CLEAVER, 1991), sendo estes dois últimos os mais comuns e importantes com relação às lesões causadas ao DNA.

Os dímeros de ciclobutano são os fotoprodutos mais presentes após à exposição à UV-C e UV-B. Eles são formados a partir da ligação covalente entre duas pirimidinas adjacentes, levando à saturação da ligação 5,6 entre estas bases. São modificações extremamente estáveis que podem resistir à altas

temperaturas e condições extremas de pH. O interesse deste tipo de lesão se dá, principalmente, devido à alta capacidade de distorção da estrutura do DNA, que é a principal forma de reconhecimento utilizada por enzimas do sistema de reparo deste dano. A parada da replicação, a alteração na capacidade de se ligar à proteínas específicas do metabolismo, parada de mecanismos de transcrição são exemplos de eventos causados pela distorção aguda da dupla fita de DNA após exposição à este tipo de radiação (MITCHELL; JEN; CLEAVER, 1991; RAVANAT; DOUKI; CADET, 2001).

Os tipos de CPD formados durante este processo dependem, principalmente, do comprimento de onda da radiação UV e da composição de DNA do organismo. Para a maioria das formas de DNA, a proporção de dímeros de timina (T-T) formados é cerca de 5 vezes maior que quaisquer outros dímeros de pirimidinas possíveis (FRIEDBERG *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2013). Outros fatores, como os nucleotídeos que flanqueiam estas pirimidinas, presença de proteínas específicas também podem influenciar a formação ou não destes sítios. A presença de adenina dos dois lados de uma sequência de duas timinas (TT) é capaz de aumentar a proporção da formação dos dímeros de timina quando comparado com sequências flanqueadas por adenina na porção 5' e guanina ou citosina na porção 3' (POVIRK; SHUKER, 1994; RASTOGI *et al.*, 2010).

Os fotoprodutos 6-4 são resultados da ligação da posição C6 de uma pirimidina com o carbono C4 da pirimidina adjacente (figura 3). A distorção causada por esta modificação é proeminente devido à qualidade quase perpendicular que as bases assumem após a irradiação. Assim como os CPD's, a formação desta lesão depende da sequência em questão porém a razão da quantidade CPD's formados em relação ao fotoproduto 6-4 é aproximadamente de 3:1 (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

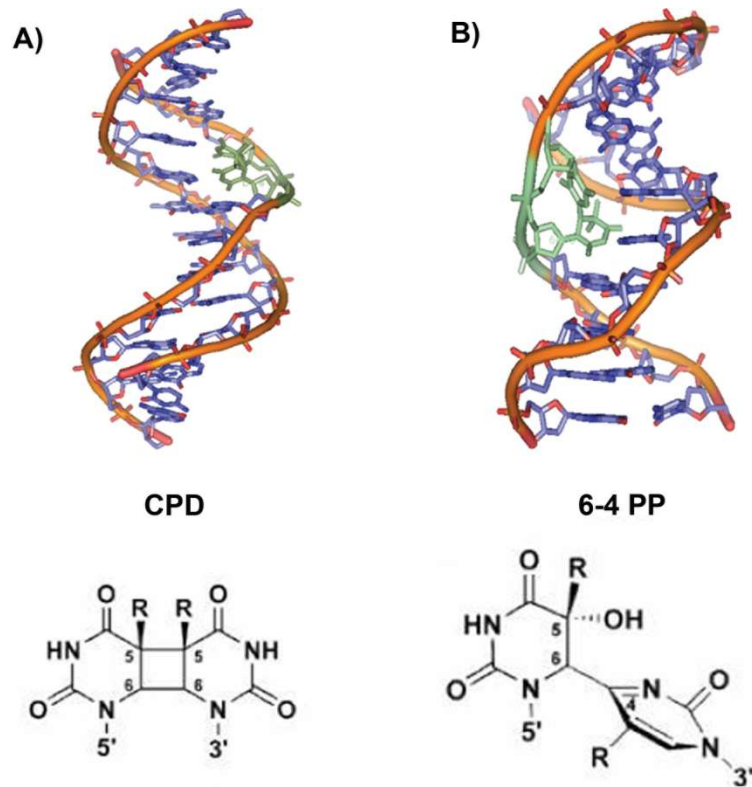


Figura 3 - Modificações no DNA causadas pela radiação UV – As duas principais modificações causadas pela exposição do DNA à radiação UV. **A)** O dímero de ciclobutano (CPD) é o tipo de lesão mais comum decorrente desta exposição. **B)** O fotoproduto 6-4 é o segundo tipo mais comum de modificação causado no DNA após exposição à radiação UV. A distorção causada por este tipo de modificação na dupla fita de DNA é mais drástica.

Além das modificações de bases descritas, ela também é capaz de causar crosslink entre DNA e proteínas. A irradiação de organismos com altas doses de radiação UV-C também foi capaz de causar quebras na cadeia de DNA de uma forma indireta causada pelo processamento da alta quantidade de danos gerados (MARTI *et al.*, 2006; RASTOGI *et al.*, 2010). Moléculas presentes nas células também podem absorver parte da radiação ultravioleta e então transferir esta energia diretamente a bases no DNA, em uma reação indireta que também é capaz de afetar o metabolismo celular. Os mecanismos pelos quais este tipo de dano pode ocorrer são variados porém bem estabelecidos na literatura (EPE, 2012).

1.2.2. Cisplatina

.A cisplatina foi descrita pela primeira vez por Michele Peyrone, em 1845, ficando conhecida como sal de Peyrone, porém sua atividade biológica foi

descrita por Barnett Rosenberg que tentava estudar o efeito de correntes elétricas no crescimento bacteriano (FRIEDBERG *et al.*, 2006). É um composto conhecido por sua atividade antitumoral devido a seu efeito citotóxico para células de replicação rápida, sendo bastante estudada em células cancerígenas. É tida como um agente alquilante bifuncional (embora não cause necessariamente uma alquilação, seu mecanismo é descrito como semelhante ao deste processo), capaz de interagir com DNA e proteínas (SIDDIK, 2003). Os crosslinks gerados pela cisplatina são capazes de bloquear completamente a transcrição e a replicação celular devido à parada de fatores de transcrição/replicação e polimerases. Apesar disso, a resistência à cisplatina já é um mecanismo bem estudado e descrito e envolve sua inativação por glutathione, alterações das cascatas de sinalizações, reparo dos adutos de forma mais eficiente e até mesmo o efluxo da droga pela célula alvo (WANG, DONG; LIPPARD, 2005).

Os agentes alquilantes bifuncionais são capazes de reagir com dois centros nucleofílicos no DNA, podendo, portanto, formar crosslink entre as fitas da molécula. Caso estes sítios se encontrem na mesma cadeia nucleotídica a reação forma um aduto intrafita. Caso os dois sítios de interação se encontrem de forma oposta à molécula, é formado um crosslink entre fitas (*interstrand DNA crosslink*) (WANG, DONG; LIPPARD, 2005). Além disso, é descrito que a cisplatina, assim como outros agentes bifuncionais, é capaz de formar crosslink entre moléculas de DNA e proteínas, porém o DNA parece ser o alvo biológico primário do composto (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; SIDDIK, 2003)

A cisplatina induz, primariamente, a apoptose das células sendo esta cascata de morte celular mediada por diversas proteínas distintas. Após a entrada na célula ocorre o processo de troca de seus íons cloro por moléculas de água. A entrada é feita por difusão passiva ou mediada pelo transportador de cobre CTR1 em células de mamíferos (ISHIDA *et al.*, 2002). Após isso, a cisplatina pode se ligar a tióis (como a glutathione) e ser transportada dentro do ambiente celular. Quando encontra a molécula de DNA seu átomo de platina é capaz de se ligar covalentemente à posição N⁷ de purinas, sendo capaz de catalisar então a formação dos adutos intrafitas e entre fitas (Figura 4A). A determinação de qual aduto será formado é dependente da orientação das fitas

com relação ao átomo de platina, da sequência de DNA e da dose utilizada (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; SIDDIK, 2003; WANG, DONG; LIPPARD, 2005). As formas mais comuns de danos encontrados no DNA são crosslinks intrafitas 1,2 ApG e GPG, que correspondem a até 90% do efeito da droga (Figura 4B) (HUANG, YALING; LI, 2013; SIDDIK, 2003). Todas estas modificações são capazes de causar grandes distorções na dupla-hélice de DNA, o que leva à parada tanto de forquilhas de replicação quanto da RNA polimerase, porém o dano com a maior distorção é causado na formação do crosslink entre fitas (SIDDIK, 2003; WANG, DONG; LIPPARD, 2005).

As respostas causadas pela cisplatina são, portanto, variadas e envolvem tanto várias proteínas de reparo (para ser capaz de lidar com o dano de crosslink entre fitas) e vias de sinalização específicas. Como será abordado depois, os adutos DNA-cisplatina são reparados primariamente pelo reparo por excisão de nucleotídeos no caso do crosslink intrafitas (DEANS; WEST, 2011; WANG, DONG; LIPPARD, 2005). O reparo, porém, de crosslink entre fitas é mais trabalhoso e envolve mais de uma via de reparo. Para este tipo de dano é necessário um processo de iniciação, o desacoplamento entre as duas fitas, uma síntese pelo local de lesão (pela via de síntese translesão), o envolvimento do reparo por excisão de nucleotídeos e, por fim, a recombinação homóloga (HUANG, YALING; LI, 2013).

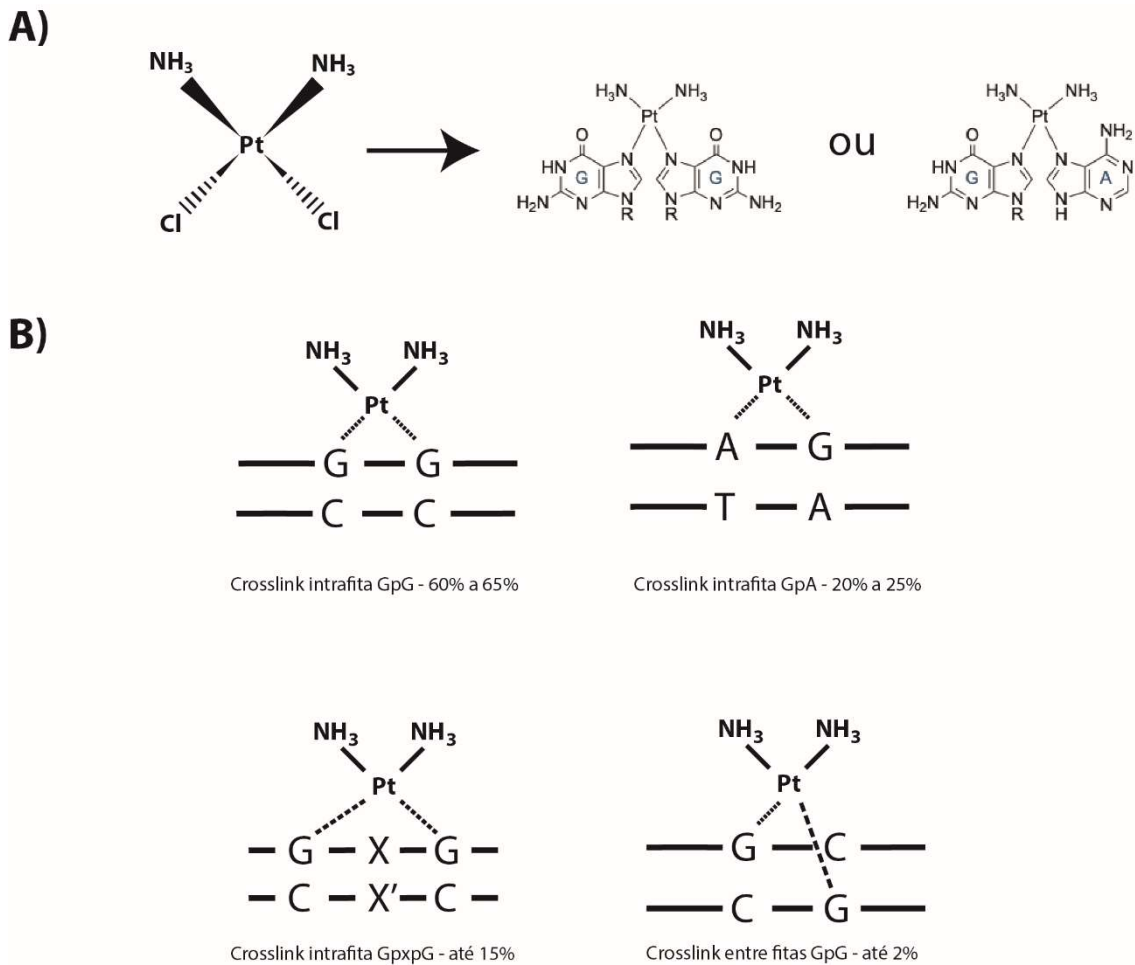


Figura 4 – Danos causados pela exposição do DNA à cisplatina - A) Estrutura da cisplatina (à esquerda) e os dois principais tipos de ligações que ela é capaz de realizar na molécula de DNA, tanto frente à uma adenina quanto à uma guanina (à direita). Em contato com o DNA a cisplatina é capaz de interagir com a posição 7 destas purinas e, desta forma, formar adutos de DNA que bloqueiam tanto a transcrição quanto a replicação. **B)** Principais consequências da ligação de cisplatina na dupla fita de DNA. Os dois tipos de danos mais comuns são os adutos intrafitas GpG e GpA (duas estruturas superiores). Estes dois tipos de adutos são os mais comuns causados pela droga, podendo totalizar até 90% de todos os danos causados. Nas duas estruturas da parte inferior da figura estão dois outros adutos possíveis de serem formados pela droga. O crosslink intrafitas GpxpG que pode corresponder a até 15% dos adutos formados; e o crosslink entre fitas, que pode corresponder a até 2% dos danos gerados pela droga.

1.2.3. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é inevitável para todas as células como consequência de viver em uma atmosfera rica em oxigênio. Espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são geradas continuamente tanto como resultado do metabolismo natural das células como a partir da exposição à diversos agentes, externos ou não (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004). Entre os

agentes que são capazes de gerar ROS se encontram as reações cíclicas do tipo Fenton, reações catalisadas por metais, agentes ambientais, metais de transição, a própria respiração celular e agentes químicos externos, como é o caso da água oxigenada (DITCH; PAULL, 2012; MARNETT; PLASTARAS, 2001). As espécies reativas de oxigênio reagem com uma gama de macromoléculas, como lipídios, proteínas, fosfolipídio e ácidos nucleicos (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004),

A maior parte do ROS intracelular é gerado a partir de erros e “vazamentos” da cadeia transportadora de elétrons associada com a redução do oxigênio durante a respiração mitocondrial (SIA, 2017), apesar de outras fontes também serem descritas (HU *et al.*, 1995). As reações do tipo Fenton, descritas por Henry John Horstman Fenton na década de 1890, tem papel fundamental na geração dos danos ao DNA. Em seu artigo, Fenton descreve como o peróxido de hidrogênio age como um oxidante muito mais forte quando é decomposto por íons de ferro, resultando em um radical hidroxila livre. A maior fonte de danos ao DNA seria devido a partir da formação de oxidantes do tipo Fenton a partir de reações catalisadas por Fe^{2+} ou outros metais de transição. Na presença de agentes redutores, como NADH, cria-se um ciclo de produção de oxidantes no organismo, como demonstrado nas reações da figura 5.

Em *T. cruzi* diversas proteínas associadas à resposta ao estresse oxidativo já foram identificadas e caracterizadas (em verde na figura), sendo as mais importantes as superóxido dismutases (que catalisam a formação de oxigênio molecular a partir de superóxido), as proteínas TSH, TcMPX e TcCPX (que catalisam a quebra do peróxido em água). A catalase, proteína muito bem caracterizada em diversos organismos está em vermelho pois não é encontrada em *T. cruzi*, embora já se tenha caracterizado os efeitos da superexpressão de uma catalase heteróloga no parasito (FREIRE *et al.*, 2017).

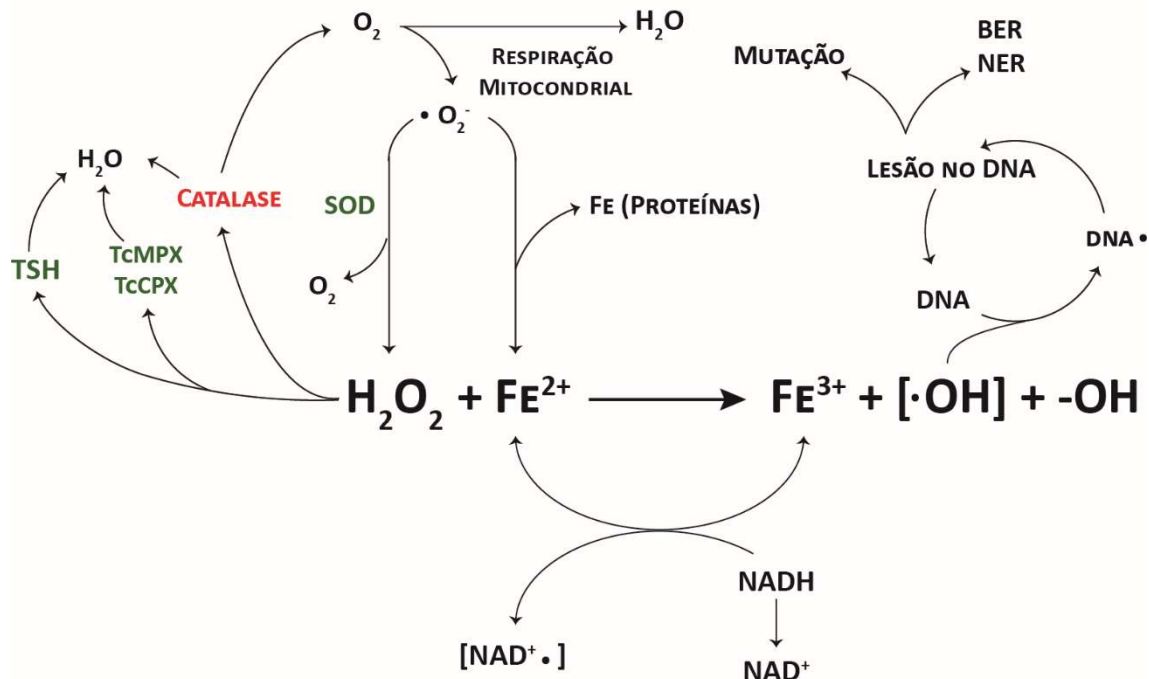


Figura 5 – Reações celulares em resposta ao estresse oxidativo causado pro peróxido de hidrogênio – Dentro da célula o peróxido de hidrogênio (endógeno ou exógeno), pode sofrer reação de Fenton, causado principalmente pelo ferro que atua como cofator de determinadas proteínas. Ao reagir com o Fe^{2+} intracelular pode ocorrer a oxidação deste íon de ferro (gerando Fe^{3+}), um radical hidroxila e um íon hidróxido, que é altamente reativo. Este íon hidróxido pode reagir com moléculas de DNA (principalmente em guaninas) causando modificações de bases e lesões no DNA. Dentre as proteínas capazes de evitar as ações do peróxido de hidrogênio estão as dismutases e peroxidases. Em verde: proteínas descritas e caracterizadas em *T. cruzi*; Em vermelho: a proteína catalase que não existe em *T. cruzi*.

1.2.4. Mt-OX

Algumas dificuldades surgem ao se tentar estudar o metabolismo de DNA mitocondrial que se relaciona com o reparo do DNA desta organela. Uma delas, e talvez a mais difícil de ser contornada, é a fonte de dano utilizada, já que se espera que as fontes convencionais de dano utilizadas em laboratório, como radiação (tanto UV quanto ionizante), peróxido de hidrogênio, cisplatina, dentre outros, sejam capazes de causar danos no DNA total das células, além de efeitos em outras macromoléculas como lipídios e proteínas.

Afim de lidar com esta situação, alguns reagentes direcionados ou específicos à mitocôndria têm sido desenvolvido ao longo dos anos (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013; FONSECA *et al.*, 2011;

HORTON *et al.*, 2008; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Um destes reagentes, recentemente descrito, foi denominado Mt-OX e desenvolvido pelo grupo da professora Dra. Shana O. Kelley, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Toronto, Canadá (WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016).

O Mt-OX foi desenvolvido a partir do uso de sequências peptídicas que alternam aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos, que tornam ele capaz de atravessar membranas internas na célula e se acumular na mitocôndria de células vivas (FONSECA *et al.*, 2011; HORTON *et al.*, 2008). O Mt-OX possui um espectro de ação similar de agentes oxidativos clássicos, como o peróxido de hidrogênio, porém com ação específica na mitocôndria de células de mamíferos. Em células HeLa e de câncer de ovário o Mt-OX, quando utilizado em uma dose de 2µM, causa dano ao DNA mitocondrial, sem quase nenhum dano detectável no DNA nuclear (WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). A redução dos níveis de transcritos e, portanto de proteínas, relacionadas à resposta ao estresse oxidativo, também aumento o nível de danos ao DNA mitocondrial destas células, bem como o número de mutações, comprovam que o reagente é específico para mitocôndrias de mamíferos (WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Em *Trypanosoma cruzi*, o reagente não foi ainda utilizado e fizemos os primeiros testes da droga neste trabalho.

1.3. Reparo de DNA

O reparo de DNA consiste em um conjunto de vias metabólicas cuja finalidade é garantir a fidelidade da informação genética e sua replicação. Como já dito anteriormente, existem várias fontes de danos ao DNA, e para cada tipo de fonte de dano ao DNA existe uma ou mais vias de reparo associadas que lidam com esta lesão (Figura 6).

A maior parte das modificações ocorridas no genoma serão reparadas pelas vias de excisão de base (BER, do inglês *base excision repair*) e de nucleotídeos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*) que serão discutidas mais adiante. De forma geral, o NER é capaz de lidar com lesões de diversas fontes, mas que causem distorções na dupla fita do DNA. Ele pode ser dividido em duas vias principais: o reparo global do genoma e o reparo acoplado à

transcrição. O BER, por sua vez, é capaz de reconhecer bases modificadas ou danificadas no DNA, e agir excisando estas bases e permitindo o recrutamento do resto da maquinaria de reparo (HOEIJMAKERS, 2001).

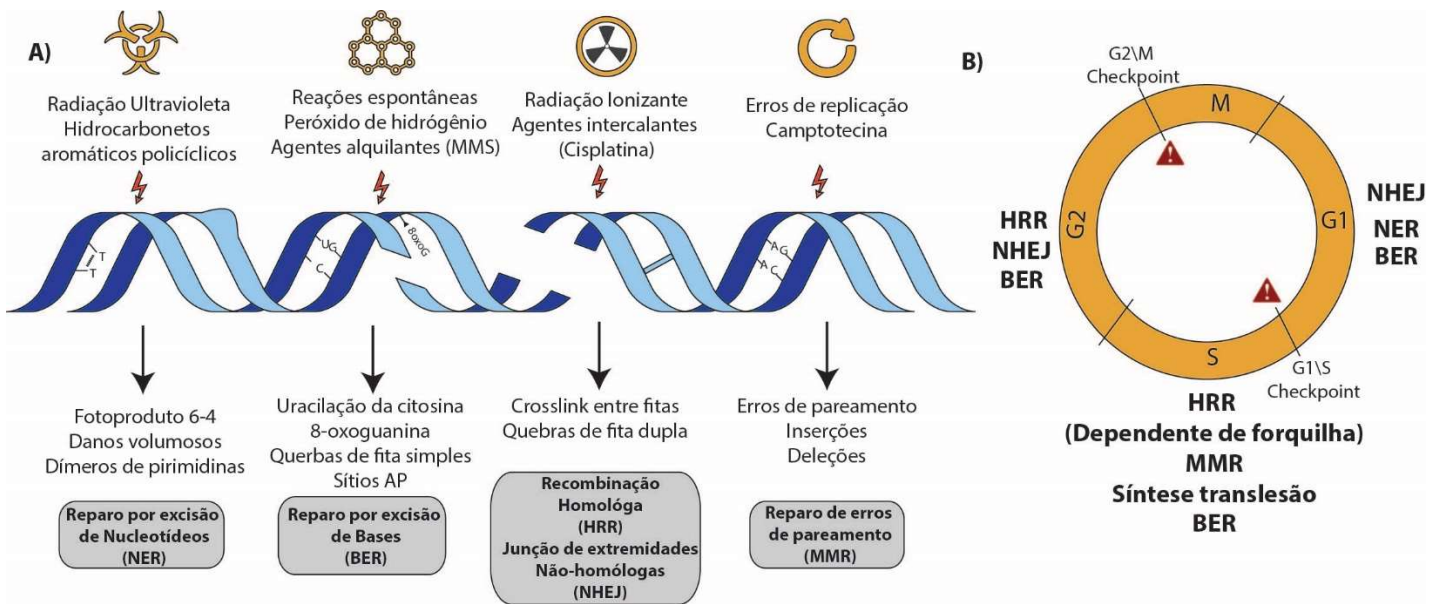


Figura 6 - Fontes de dano ao DNA e principais vias de reparo – A) Diversas fontes de dano ao DNA ativam vias específicas de reparo de DNA. Dependendo do tipo de modificação de base ou lesão as vias de reparo podem ser ativadas para lidar com o dano. **B)** As vias de reparo são dependentes do ciclo celular. Na figura estão representados, por fase do ciclo, as principais vias de reparo em cada fase do ciclo celular, além de ser destacado dois pontos de checkpoint que podem causar parada do ciclo celular dependente de dano ao DNA.

Bases erroneamente incorporadas também podem gerar mutações após a replicação celular, caso persistam no genoma. Para lidar com estas situações, o reparo por erro de pareamento (MMR do inglês *mismatch repair*) é acionado para evitar a geração destas mutações. Células que possuem problemas na via de reparo por erro de pareamento apresentam um aumento significativo em sua taxa de mutação (LI, GUO MIN, 2008).

Quebras duplas que possam ser causadas por agentes externos possuem, em eucariotos superiores, duas vias de reparo preferenciais: o reparo por recombinação homóloga (HRR, do inglês *homologous recombination repair*) e a junção de pontas não-homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) (HOEIJMAKERS, 2001). A via de reparo NHEJ é susceptível a erros, porém é a via mais comum para lidar com estas quebras em eucariotos multicelulares. Esta via envolve modificações nas duas pontas da quebra para

torná-las compatíveis para que possam ser reconectadas. Essa via, porém, pode levar à perda da informação contida na região da quebra (LIEBER *et al.*, 2003). A recombinação homóloga é uma via presente nos organismos que é capaz de reparar danos ao DNA de uma forma dependente de um molde. O reparo realizado por esta via é de alta fidelidade e, além do reparo de DNA, este processo possui papel fundamental em outros processos do metabolismo como a meiose e a mitose (HEYER, WOLF DIETRICH, 2007). A escolha da via para lidar com a quebra dupla parece estar relacionada com a presença ou não de uma segunda cópia idêntica do local lesionado e a fase do ciclo celular. A falta de uma cópia para a homologia necessária ao reestabelecimento da informação perdida no local da quebra, leva o organismo a optar pela via NHEJ (HOEIJMAKERS, 2001).

Em situações nas quais os sistemas de reparo não conseguem lidar com os danos, mas a célula não pode continuar com um bloqueio de seu ciclo celular os organismos podem ativar uma via de tolerância ao erro, que permite a sobrevivência, ainda que ao custo da geração de mutações. Este processo de síntese translesão é uma via de salvamento, parte da resposta SOS, que permite à continuidade do ciclo celular (ZHAO; TODD WASHINGTON, 2017).

Enquanto as vias de reparo evitam ao máximo a incorporação de erros frente à agentes mutagênicos, o processo de síntese translesão insere nucleotídeos em situações nas quais existe uma lesão que não possa ser reparada naquele momento (PRAKASH; JOHNSON; PRAKASH, 2005). Em alguns casos esta inserção pode não ter efeito mutagênico, porém, em outros, este sistema pode gerar mudanças drásticas nas porções de DNA expostas à agentes mutagênicos. Grande parte da mutagênese causada pela radiação UV, por exemplo, tem sua base molecular em DNA polimerases translesão que inserem nucleotídeos em pareamento errado (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Estas DNA polimerases translesão são encontradas tanto em procariotos (como as enzimas DinB e UmuC) como em eucariotos (polimerases das famílias Y e B) (PRAKASH; JOHNSON; PRAKASH, 2005).

A escolha da ativação correta das vias de reparo frente ao dano também depende de fatores além do tipo de dano gerado. Além das cascatas de

sinalização, já descritas como importantes na ativação destas vias, o controle do ciclo celular e o ponto no qual a célula se encontra é de fundamental importância para o reparo (BRANZEI; FOIANI, 2008). Durante o ciclo celular existem estruturas específicas de cada fase do ciclo (como forquilhas de replicação colapsadas que são encontradas apenas na fase S). Estas estruturas, juntamente com o fato de que algumas vias, como a recombinação homóloga, dependem de fatores além da presença do dano apenas para serem completadas, cria uma relação entre a fase do ciclo celular e a via a ser ativada (Figura 6B). A recombinação homóloga, por exemplo, é uma via preferencial durante a fase S, quando existe a oferta de um DNA molde para o reparo. Durante a fase S também já foi descrita uma ativação maior das vias de salvamento (TLS) na presença de grandes distorções na dupla hélice (BRANZEI; FOIANI, 2008), um fato de fácil racionalização se for considerado que é importante que a célula garanta a replicação do DNA, mesmo que a custo do surgimento de algumas mutações. O reparo de erros de pareamentos também é característico de fase S.

Durante a fase G1 do ciclo celular as células de mamíferos dependem da via de NHEJ para lidar com as quebras de fita dupla, e basicamente do NER associado à transcrição para lidar com os adutos de DNA (BRANZEI; FOIANI, 2008). Importante salientar que, apesar de preferenciais, estas vias podem estar envolvidas no metabolismo de DNA ou suas proteínas podem possuir funções não canônicas ou sobrepostas na célula (NEMZOW *et al.*, 2015). Apesar de ser didática a separação em vias para o estudo, o metabolismo de DNA é integrado com o metabolismo celular.

1.3.1. Reparo por excisão de bases

O reparo por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*) já foi descrita como a via mais comum de ser utilizada na natureza, devido à quantidade de proteínas capazes de reconhecer diversas bases modificadas e da óbvia importância que o estresse oxidativo tem para os seres vivos. A ativação desta via se dá a partir do reconhecimento de modificações nos nucleotídeos.

A via do BER (Figura 7) se inicia a partir da ação de uma classe de enzimas denominadas DNA glicosilases que são capazes de catalisar a hidrólise da ligação N-glicosil entre as bases nitrogenadas e o esqueleto de ribose e fosfato do nucleotídeo. Estas glicosilases são, muitas vezes, específicas para um tipo de modificação de uma das bases, ou para bases que não deveriam estar presentes na molécula de DNA, como as uracil DNA glicosilases (JACOBS; SCHÄR, 2012; JURADO *et al.*, 2004; KROKAN; DRABLØS; SLUPPHAUG, 2002). A deleção total ou parcial de cópias das DNA glicosilases tem efeitos diversos. A gravidade dos fenótipos observados varia de acordo com o gene deletado e o organismo estudado, fato que pode estar relacionado com o tipo de dano reconhecido. DNA glicosilases relacionadas com estresse oxidativo são mais estudadas e são importantes para o metabolismo de DNA dos diversos organismos (JACOBS; SCHÄR, 2012).

Após a clivagem do DNA pelas DNA glicosilases ocorre a formação de um sítio apurínico\apirimidínico chamado de sítio AP, no qual apenas a base nitrogenada modificada é retirada, mas não ocorre clivagem da ligação fosfodiéster do esqueleto de fosfato-açúcar da dupla-hélice de DNA. A partir deste ponto a via pode seguir dois caminhos, denominados *short-patch* e *long-patch*. Na via de *short patch* ocorre a remoção do esqueleto de fosfato-açúcar apenas do sítio AP da base danificada no DNA. Esta remoção pode ser catalisada por uma enzima específica (chamada AP endonuclease) ou por glicosilases bifuncionais, que possuem atividade de AP liase e são capazes de, ao remover a base nitrogenada, também realizar a limpeza do local de incisão. Nos dois casos, esta remoção permite a exposição da ponta 3'-OH necessária para que ocorra a síntese por uma DNA polimerase e a ligação por uma DNA ligase. Após a ação da AP endonuclease a via também pode optar pela via de *long-patch* (a direita na figura 7), que se difere pelo número de nucleotídeos removidos ao final do processo. Após a limpeza da lesão, a DNA polimerase ao sintetizar a nova molécula de DNA ocasiona o deslocamento de uma porção de até 13 nucleotídeos. Isto ocasiona a formação de uma aba 5', no qual age uma flap endonuclease (FEN1) clivando esta porção e gerando uma porção que possa ser ligada pela DNA ligase (CHEN, JIA; FURANO, 2015)

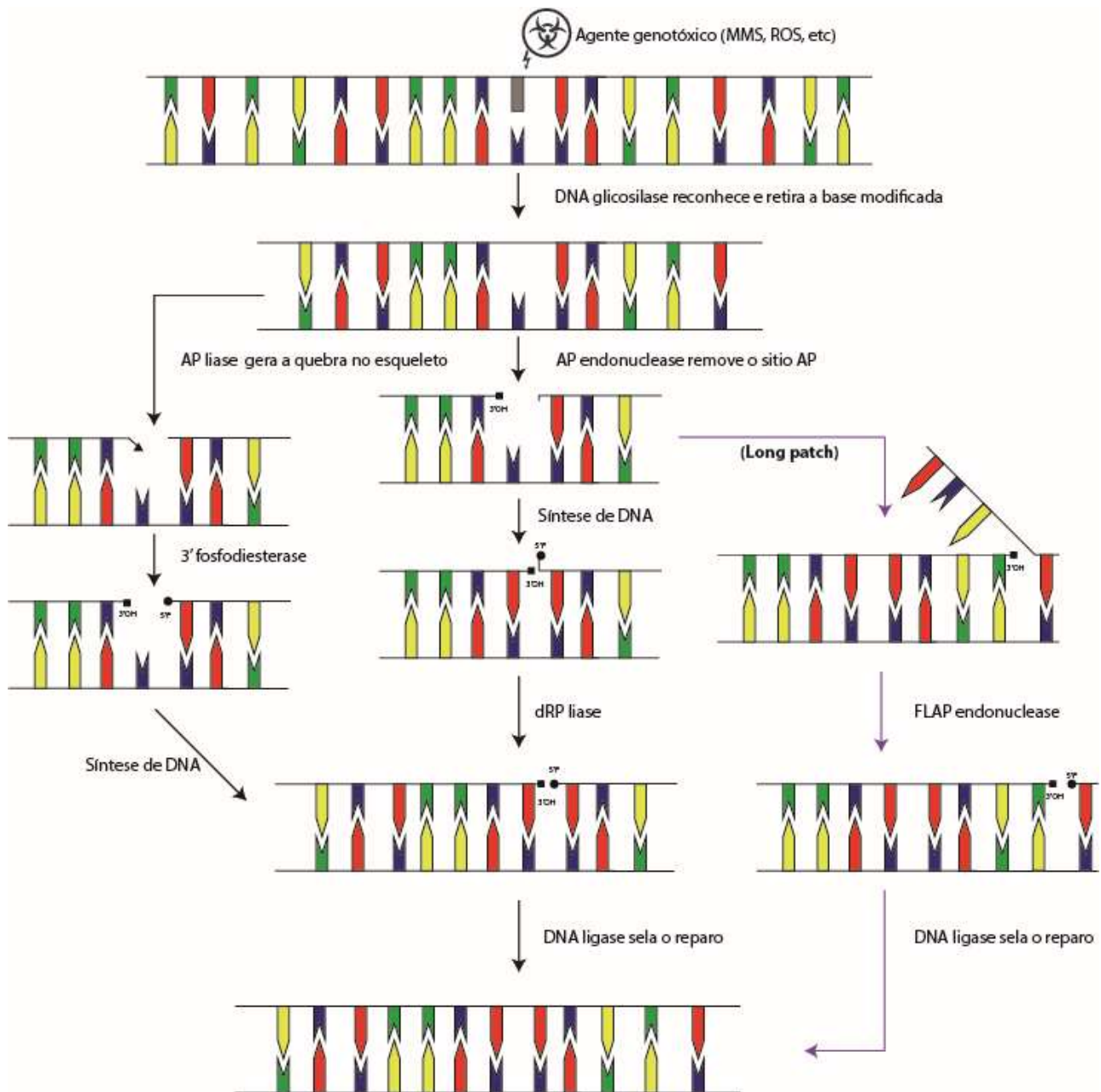


Figura 7 - Reparo por excisão de bases – Esquema representativo do reparo por excisão de bases. Esta via lida com a remoção de bases modificadas e, por isso, possui uma grande variedade de DNA glicosilases para o reconhecimento destas modificações. Caso esta glicosilase seja bifuncional, ela é capaz de catalisar tanto a remoção da base quanto a quebra do esqueleto açúcar-fosfato do DNA (reações a esquerda e ao centro). Caso ela seja monofuncional, ocorre a atuação de uma AP endonuclease, que faz a remoção do sítioapurínico ou apirimidínico, para que ocorra a síntese e limpeza do *nick* gerado. Em uma terceira via (destacada à direita), após a excisão da base e atuação da AP endonuclease, ocorre a síntese de DNA, gerando uma aba que pode ser reconhecida por uma FLAP endonuclease, que faz a limpeza do local de quebra. Em todas as vias, uma DNA ligase sela a quebra e conclui o reparo.

Vários genes da via de BER já foram descritos em *Trypanosoma cruzi*. Já foram descritas diversas DNA glicosilases, dentre elas as responsáveis pelo sistema GO, um sistema de reparo específico para lidar com a 8-oxoguanina que é o principal dano geral pelas ROS (BOITEUX; COSTE; CASTAING, 2017; MICHAELS; MILLER, 1992). O sistema GO (Figura 8) é uma subvia do BER composta por três diferentes enzimas em *E. coli*: OGG1, capaz de reconhecer 8-oxoguaninas inseridas na dupla fita de DNA e clivar esta base modificada; MutY, capaz de reconhecer adeninas pareadas de forma errada frente à 8-oxoguaninas e removê-las, permitindo que a enzima OGG1 depois catalise a retirada da base oxidada; e a proteína MutT, capaz de hidrolisar 8-oxodGTP em 8-oxodGMP ainda no pool de nucleotídeos, fazendo com que esta base modificada nem seja inserida no DNA, evitando assim seus efeitos mutagênicos (MICHAELS; MILLER, 1992).

Em *Trypanosoma cruzi* a análise do genoma revelou a presença de homólogos para as três proteínas. As enzimas TcOGG1 (com função homóloga à da enzima OGG1 de bactérias) e o homólogo de MutT (TcMTH) já foram caracterizados em nosso laboratório (AGUIAR *et al.*, 2013; FURTADO *et al.*, 2012). TcMYH, homóloga à MutY e terceiro componente do sistema GO é um dos alvos deste estudo. Esta proteína já foi localizada no cinetoplasto do parasito em experimentos prévios de nosso laboratório (KUNRATH-LIMA, 2013) e, portanto, um dos objetivos deste trabalho é determinar como a superexpressão de TcMYH poderia afetar o metabolismo de DNA mitocondrial.

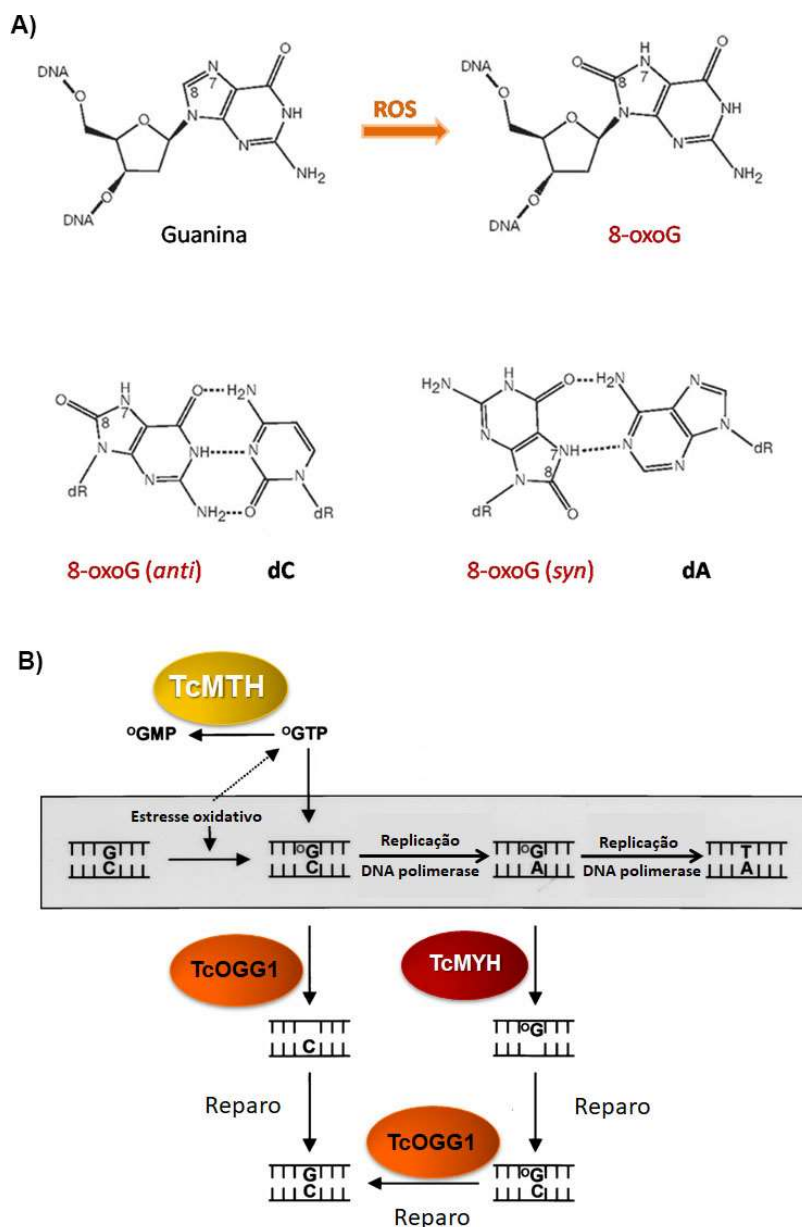


Figura 8 – 8-oxoguanina e Sistema GO – A) Estrutura da 8-oxoguanina gerada após a exposição ao estresse oxidativo. A modificação ocorre a partir da oxidação da posição 8 da base, tanto na fita de DNA quanto no pool de nucleotídeos. Abaixo os dois pareamentos que a 8-oxoguanina é capaz de realizar, tanto com a citosina quanto com a adenina (este pareamento tem alto potencial mutagênico) **B)** Esquema do Sistema GO, responsável por lidar com a capacidade mutagênica da 8-oxoguanina. A presença da base modificada pode resultar, após a replicação, em uma transversão G:C para T:A. O sistema GO que é composto por três proteínas em *E. coli*, possui homólogos identificados no genoma de *T. cruzi*. TcOGG1, que é capaz de catalisar a retirada da 8-oxoguanina na dupla fita de DNA e gerar um sítio AP; TcMYH que reconhece e retira a adenina pareada de forma errada frente à 8-oxoguanina; TcMTH que é capaz de evitar a incorporação de guaninas oxidadas no pool de nucleotídeos a partir da hidrólise da o 8-oxodGTP em 8-oxodGMP, evitando assim a incorporação da base na fita de DNA

1.3.2. Reparo por excisão de nucleotídeos

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, em inglês *nucleotide excision repair*) foi uma das primeiras vias a ser elucidada em células de mamíferos, logo após o início da caracterização da via em procariotos (FRIEDBERG *et al.*, 2006). De todas as vias de reparo, possivelmente o NER é a via que reconhece mais tipos de danos distintos (HOEIJMAKERS, 2001) variando desde o reconhecimento de CPDs e 6-4PPs causados por radiação UV, adutos causados por cisplatina e outros alquilantes, crosslinks entre fitas e purinas modificadas por estresse oxidativo em alguns casos (MARTEIJN *et al.*, 2014). Os estudos com NER se deram, em grande parte, devido o estudo de grupos de complementação de células de pacientes com Xeroderma Pigmentoso (XP), uma doença autossômica recessiva que é caracterizada pela alta susceptibilidade à radiação UV e surgimento de câncer (SUGASAWA, 2008).

A via do NER é responsável por reconhecer e remover os danos que causem distorções na dupla hélice de DNA (MARTEIJN *et al.*, 2014). Ele é subdividido em duas vias principais: uma acoplada à transcrição (TC-NER) e a via de reparo de genoma global (GG-NER) que detecta lesões por todo o genoma do organismo. Apesar da semelhança entre as etapas finais das duas vias, os fatores de reconhecimento, as proteínas envolvidas e alguns processos possuem características específicas (HOEIJMAKERS, 2001; MARTEIJN *et al.*, 2014).

O TC-NER (Figura 9, à esquerda) é a via responsável por reconhecer erros na fita que é transcrita dos genes, após a parada da maquinaria de transcrição (MELIS; VAN STEEG; LUIJTEN, 2013). De forma geral, em células eucarióticas, o processo de reparo se inicia com a parada da RNA polimerase II (RNA PolII). As proteínas CSA e CSB, envolvidas com este tipo de reparo e com controle de transcrição da RNA PolII, são recrutadas para o local do dano. Ainda não se sabe ao certo a função da proteína CSA durante este processo, porém sabe-se que ela, que faz parte do complexo bifuncional CLR4 (que também contém as proteínas DBB1, CUL4, RBX1 E3 ligase), está envolvida com o bloqueio da elongação da transcrição durante o reparo e a liberação após a correção do dano. A proteína CSB, essencial ao processo, também é essencial ao processo de reconhecimento da lesão, faz parte da família SWISNF e atua

fazendo a retirada da RNA polimerase parada ou deslocando-a para que ocorra o reparo (FRIEDBERG, 2011; MELIS; VAN STEEG; LUIJTEN, 2013). Outras proteínas também já foram descritas como atuando juntamente com CSB, tanto na estabilização do complexo com a RNA polimerase, quanto na sinalização e ligação da mesma ao DNA (MARTEIJN *et al.*, 2014).

Para o GG-NER (Figura 9, à direita) o processo de reconhecimento possui elementos distintos do TC-NER. Em células de mamíferos o complexo formado por XPC-Rad23B-CETN2 juntamente do complexo formado por CUL4 e UVDBB são responsáveis pelo reconhecimento do local de lesão (HOEIJMAKERS, 2007). A proteína XPC está envolvida em diversas funções distintas relacionadas ao metabolismo de DNA (NEMZOW *et al.*, 2015) e, para a via de reparo, é capaz de se ligar à diferentes conformações da dupla hélice, incluindo erros de pareamento e modificações de base. No modelo atual proposto XPC se liga primeiro ao filamento de fita em frente à modificação ou distorção na hélice, a partir da inserção do braço que contém o β -hairpin na porção C-Terminal (CHEN, XUEJING *et al.*, 2015). Devido a isso, ocorre a abertura da fita de DNA e o processo pode ser sinalizado para continuação. Apesar de estudos e de análises de estrutura demonstrarem que danos causados por UV, principalmente o CPD, são substratos pobres para XPC e a atuação dos outros fatores (UV-DDB e CLR) permite o reconhecimento eficaz da distorção na hélice (MARTEIJN *et al.*, 2014). Ainda existem dúvidas quanto à medida exata pela qual XPC se move pelo genoma e localiza a lesão, mas estudos sugerem a possibilidade de, ao invés do escaneamento contínuo, o complexo de XPC faz sondagem pelas moléculas de DNA através de saltos até que encontre uma região danificada (HOOGSTRATEN *et al.*, 2008).

Após o reconhecimento, as etapas seguintes do processo são iguais para as duas subvias. A ligação das proteínas de reconhecimento para as duas vias permite então o recrutamento do complexo TFIIH que atua no controle tanto da transcrição quanto do reparo. O fator TFIIH possui mais de dez proteínas, divididas em dois subcomplexos, sendo o primeiro chamado de cerne, no qual se encontram as DNA helicases XPB e XPD e, em eucariotos superiores, cinco outras proteínas associadas (p62, p52, p44, p34 e p8\TTD). O segundo subcomplexo é chamado CAK (complexo ativador de cinase), descrito como

sendo responsável pelas funções de controle de transcrição e sem envolvimento no reparo. É descrito que, após a sinalização e ligação de TFIIH, mediada por XPC, o subcomplexo CAK na verdade se dissocia, ao passo que as proteínas p8\TTD se tornam ligadas ao complexo. As helicases XPB e XPD então estendem a abertura na molécula de DNA, e fazem a verificação da região do dano (função que também parece envolver a proteína XPA) (MARTEIJN *et al.*, 2014). Após a verificação do dano, a via chega no seu ponto de comprometimento máximo, com a incisão das porções 5' e 3' do local do dano, catalisado respectivamente pelas endonucleases XPF/ERCC1 e XPG. De forma geral, essa incisão gera um *gap* na fita de cerca de 22 a 30 nucleotídeos, gerando um filamento de fita simples que pode ser utilizado para sinalizar, via ATR, o recrutamento de uma DNA polimerase para reparar esta região (MARTEIJN *et al.*, 2014). Por fim, uma DNA ligase pode ser usada para selar a região reparada.

Em tripanossomatídeos a via do NER é conservada, apesar de possuir ausência de determinadas proteínas ou pequenas modificações em outras. Em um trabalho recente, foram caracterizadas as proteínas XPC e CSB (MENDES, 2015). Foi demonstrado que a superexpressão e deleção de uma cópia do gene de CSB é capaz de alterar a sobrevivência do parasito frente à cisplatina e radiação ultravioleta, sendo que a superexpressão de TcCSB aumenta a sensibilidade do parasito logo após a irradiação, ao passo que o heminocaute só é mais sensível após 24 horas; no caso da proteína XPC, a simples deleção causou problemas de replicação no parasito, resultando em formas aberrantes com relação ao número de núcleos e cinetoplastos e um ciclo celular mais longo. Além disso, estes parasitos também foram mais resistentes ao tratamento com cisplatina e não apresentaram diferença na sobrevivência após irradiação com radiação UV, sugerindo que, em *T. cruzi* a via preferencial que lida com os danos causados por UV é o TC-NER (MENDES, 2015). Juntos, estes resultados sugerem que, devido à natureza da transcrição de *T. cruzi*, que é policistrônica e engloba quase todo o genoma, a via de GG-NER pode possuir funções não canônicas com relação ao esperado e já estudado em outros organismos. Nenhum estudo sobre o reparo mitocondrial relacionado ao NER foi feito ainda em *T. cruzi*.

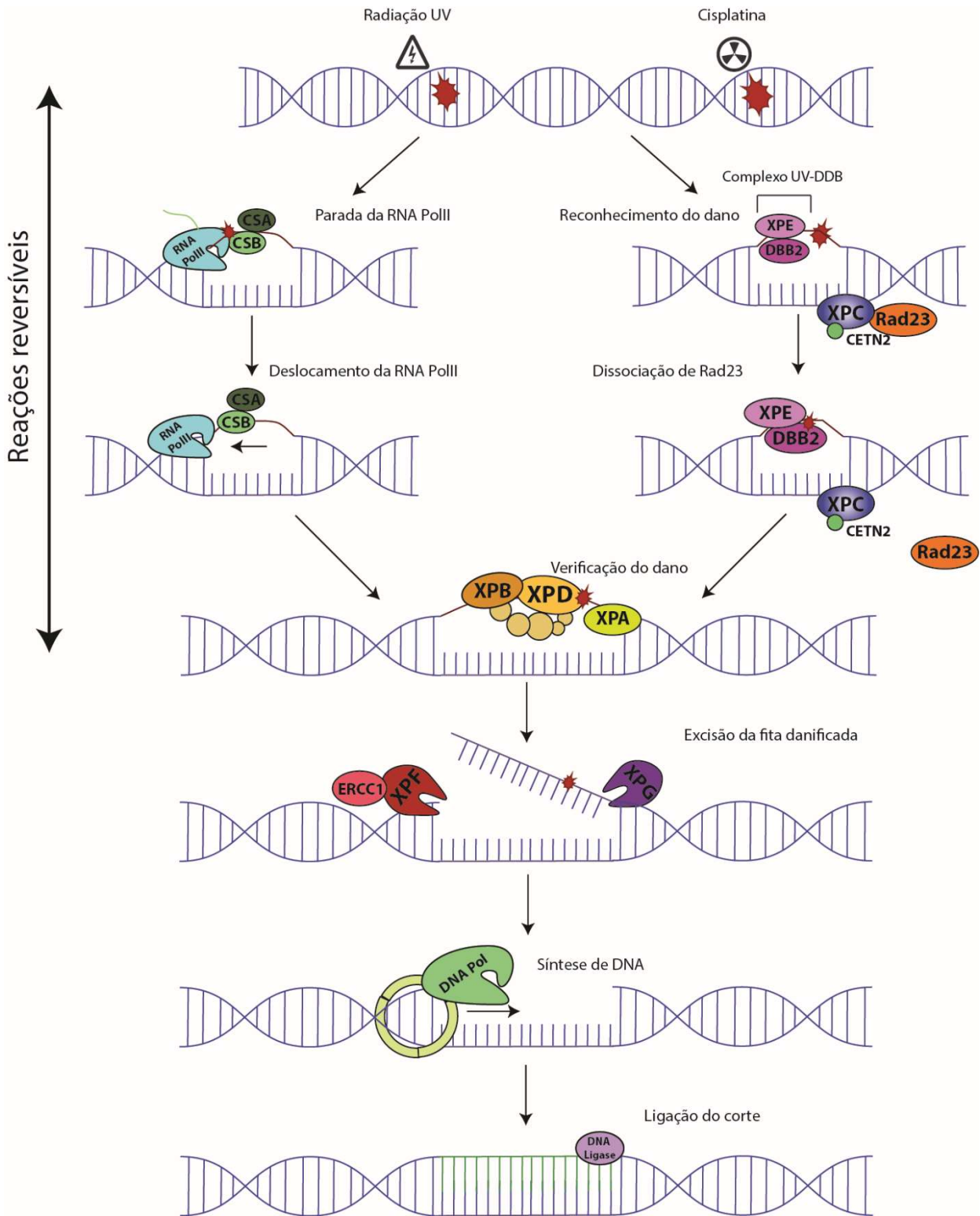


Figura 9 - Reparo por excisão de nucleotídeos – O reparo por excisão de nucleotídeos possui duas subvias principais. Os passos iniciais de reconhecimento envolvem processos e proteínas distintas. A via do reparo acoplado à transcrição (TC-NER) se inicia a partir do reconhecimento de uma RNA polimerase parada por um complexo de proteínas, mas que tem como principal sinalizadora a proteína CSB, capaz de reconhecer problemas de transcrição causados a partir

desta parada da RNA polimerase. A direita o reparo global do genoma (GG-NER), no qual a proteína XPC, associada com outras proteínas, é capaz de reconhecer grandes distorções na dupla hélice tanto em regiões transcritas como em regiões não transcritas. Após o reconhecimento elas convergem para as mesmas etapas, nas quais ocorre a verificação do dano, a excisão da fita danificada pelas nucleases específicas, remoção do local da incisão, a polimerização de uma nova fita de DNA no local e ligação para finalizar o reparo. Alguns complexos possuem diversas proteínas e estas foram omitidas, deixando apenas as principais proteínas representadas na figura.

1.3.3. Resposta ao dano no DNA

Agentes genotóxicos, como dito anteriormente, geram uma variedade de danos ao DNA e o organismo tem que ser capaz de modular seu metabolismo em reação à cada uma destas agressões. A detecção e alteração de metabolismo decorrente do dano ao DNA é feita a partir da interação de uma rede de diversas proteínas sensoras e efetoras, este conjunto de alterações e proteínas constitui a resposta ao dano no DNA (HANAWALT, 2015).

Já foi descrito, em eucariotos, que as vias de resposta ao dano no DNA atuam de forma dependente da fase do ciclo celular. Esta diferença é reflexo do fato de que as fontes de danos, principalmente endógenas, são também dependentes da fase do ciclo celular. Na fase G1 é descrito, por exemplo, que a principal fonte de danos endógenos da célula é o estresse oxidativo acidental e as radiações naturais, ao passo que na fase S e G2 os organismos necessitam lidar também com problemas de forquilha de replicação, erros de pareamento e gaps deixados durante a replicação (BRANZEI; FOIANI, 2008). Da mesma forma, os mecanismos que a célula conta para lidar com os danos também são distintos, esta diferença sendo evidente na regulação da atuação da recombinação homóloga e NHEJ durante o ciclo celular (HEYER, WOLF-DIETRICH; EHMTEN; LIU, 2010; KREJCI *et al.*, 2012), já que um dos fatores críticos na determinação da via de reparo a ser executada é a presença de uma cromátide irmã, existente durante a fase S.

Apesar de muito complexa a resposta ao dano ao DNA envolve principalmente duas vias chave: a via de ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) e a via de ATR (*Ataxia telangiectasia Rad3 related*) (SMITH *et al.*, 2010). A importância destas proteínas se dá no fato de os componentes e a forma com

estas vias atuam serem conservados de leveduras à humanos (HANAWALT, 2015).

A ativação de ATM, uma fosfatidil inositol 3 cinase, é feita a partir da auto fosforilação da proteína que leva à dissociação da molécula de seus dímeros e à sua liberação. Esta ativação é rápida e ocorre quando a célula apresenta quebras de fitas dupla, sendo mediada possivelmente pelo complexo MRN (Mre11-Rad50-NBS1) que atua na ressecção durante o reparo de quebra de fitas dupla (BRANZEI; FOIANI, 2008; SMITH *et al.*, 2010). Uma vez ativada, ATM leva à fosforilação de CHK2, DNA-PK's, AKT's dentre outras proteínas, que também causam a fosforilação e ativação e várias outras transdutoras e efetoras do sinal. Considerando trabalhos de proteômica, mais de 1000 proteínas se relacionam direta ou indiretamente com ATM, englobando alterações em mais de 15 vias de metabolismo distintas (MU *et al.*, 2007; SHILOH; ZIV, 2013). Dentre estas vias, além das de reparo e controle de metabolismo celular, encontram-se vias de síntese de proteína, de mRNAs, metabolismo energético e vias de morte celular.

A localização de ATR nos locais de dano se dá em reconhecimento à filamentos de fita simples ligados à RPA no DNA (RPA-ssDNA (SALDIVAR; CORTEZ; CIMPRICH, 2017). O reconhecimento de filamentos de RPA-ssDNA para ativação de ATR envolve também a proteína ATRIP (do inglês ***ATR-interacting protein***) e o complexo 9-1-1 (CIMPRICH; CORTEZ, 2008). Outras proteínas também são associadas com a ativação e sinalização de ATR, como TOPBP1 (SALDIVAR; CORTEZ; CIMPRICH, 2017), mas já é descrito que a estrutura primária que ativa esta via são filamentos de fita simples associados à RPA, situação que pode emergir por problemas de transcrição causados por dano ao DNA, ressecção da fita de DNA em locais de quebra dupla e problemas de replicação (SMITH *et al.*, 2010). Assim como na ativação de ATM, as modificações causadas pela ativação de ATR são diversas e englobam várias vias distintas de metabolismo.

A complexidade das vias de resposta ao dano ao DNA é alta e, apesar de didática a separação, elas atuam em conjunto. É descrito, por exemplo, que durante a resposta à quebras de fita dupla ocorre uma troca entre a sinalização de ATM e ATR, devido à ação das enzimas de ressecção do complexo MRN,

Exo1, CtIP e BLM (SAHA; WANG; CUCINOTTA, 2013). Já foi descrito também que células humanas de origem tecidual diferente também possuem idiosincrasias na ativação da resposta ao dano ao DNA. Os tipos de estrutura encontradas no DNA, a fase do ciclo celular e o tipo de lesão geradas também são fatores na escolha da via de resposta ao dano de DNA (BRANZEI; FOIANI, 2008).

Uma proteína central na resposta decorrente da sinalização de ambas proteínas é o fator de transcrição p53 (DITCH; PAULL, 2012; SIDDIK, 2003). Em *T. cruzi* esta proteína está ausente e, embora o parasita possua vários pontos da via de resposta de dano ao DNA em comum com eucariotos superiores, não se sabe quais proteínas teriam função semelhante à de p53. Sabe-se que frente à danos que estão relacionados com parada de transcrição o parasito é capaz de sinalizar para a morte (MENDES, 2015). Em *T. cruzi* a modulação dos níveis de RNA em resposta à outro tipo de dano, a radiação ionizante, consiste em redução de RNA's relacionados ao metabolismo energético (GRYNBERG *et al.*, 2012), em um perfil de resposta que se assemelha com o encontrado em leveduras (CAGNEY *et al.*, 2006; TKACH *et al.*, 2012).

1.4. Vias de reparo do DNA mitocondrial

Ao passo que as principais vias de reparo de DNA no núcleo já foram bem descritas, não se tem certeza ainda da presença ou ausência de todas estas na manutenção do DNA mitocondrial. Devido à presença de ROS e outros fatores ainda sendo estudados, sabe-se que a taxa de divergência entre duas sequências de DNA mitocondrial em células de mamíferos é 10 vezes maior que a mesma taxa quando são comparadas sequências do DNA nuclear (HOWELL, 1998). Apesar de discussões acerca destes valores, é consenso que processos do metabolismo do mtDNA são específicos e, portanto, ocasionam consequências distintas daqueles observados no núcleo celular. As regiões de início de transcrição e replicação (D-loop) da mitocôndria de células de mamíferos, por exemplo, já foram descritas como tendo uma frequência de mutação superior em 100 vezes àquela encontradas em regiões de mesma função nos núcleos celulares (BIANCHI; BIANCHI; RICHARD, 2001).

A princípio, o genoma mitocondrial está sujeito aos mesmos tipos e fontes de lesão que o genoma nuclear de qualquer célula. Na maioria dos organismos, porém, a presença de várias mitocôndrias faz com que nem sempre seja fácil se determinar os efeitos de danos ao DNA mitocondrial, a não ser que várias mitocôndrias apresentem problemas ao mesmo tempo. É especulado, porém, que falhas graves no funcionamento mitocondrial seriam inviáveis para a maioria dos organismos (ALEXEYEV *et al.*, 2013; COPELAND; LONGLEY, 2014; HUANG, YALING; LI, 2013). Todavia, algumas fontes de dano merecem maior consideração na análise da mutagênese mitocondrial. A própria função mitocondrial, que acarreta na proximidade física do mtDNA com a membrana interna da mitocôndria, faz com que uma das principais fontes de dano à molécula seja a ação de ROS. Isso, junto a trabalhos clássicos que demonstram a ausência de vias de reparo para lidar com danos causados por UV e cisplatina (Figura 10) (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974; PASCUCCI *et al.*, 1997; PODRATZ *et al.*, 2011; TREMEAU-BRAVARD *et al.*, 2004), é refletido na grande maioria dos artigos que visa entender o BER e as respostas ao estresse oxidativo provenientes da organela. Além dos danos oxidativos, as principais fontes descritas de danos ao mtDNA são agentes alquilantes, formação de adutos e intermediários de replicação que impedem a progressão de polimerases, erros de pareamento, quebras de fita dupla e simples e danos provenientes da atuação de enzimas do metabolismo celular (ALEXEYEV *et al.*, 2013).

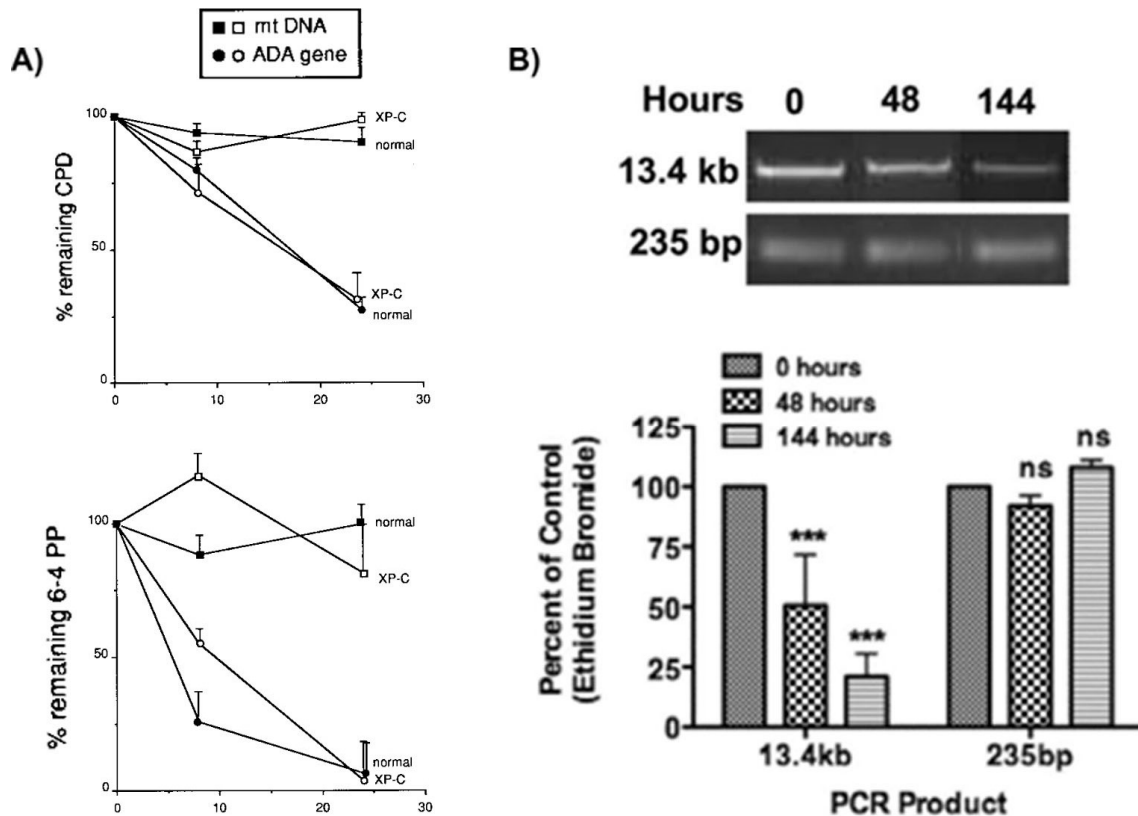


Figura 10 - Danos relacionados ao NER não são reparados em mitocôndrias de mamíferos – A) Medição dos níveis de CPD e 6-4 PP, produtos da exposição do DNA à radiação UV, em fibroblastos humanos normais e deficientes para o gene XPC. Após 24 horas, as duas linhagens apresentam níveis altos de lesões no DNA mitocondrial (Adaptado de Pascucci, 1997). **B)** Determinação do nível de dano no DNA mitocondrial de neurônios humanos após tratamento com cisplatina utilizando a técnica de PCR de fragmento longo. Mesmo após períodos tão longos quanto 144 horas é possível observar que a amplificação de fragmentos grandes é menor em comparação com a amplificação de fragmentos curtos, indicando a persistência dos danos no DNA mitocondrial após este tempo.

Apesar da ausência clara da função do NER na manutenção da mitocôndria, já foram descritas diversas proteínas tanto desta via, quanto de outras, atuando em funções não-canônicas. Em diversos organismos já foram descritas a reversão direta, o reparo por erros de pareamento, processos de recombinação homóloga e junção não homóloga e principalmente o BER (ALEXEYEV *et al.*, 2013; HOLT, 2009). A falta do NER na mitocôndria, porém, não implica que suas proteínas não se relacionam com a organela. Recentemente alguns trabalhos descreveram proteínas desta via de reparo atuando em funções metabólicas que talvez não sejam diretamente o reparo de

DNA, mas que claramente alteram o metabolismo mitocondrial normal (MORI *et al.*, 2017).

Em *Trypanosoma cruzi*, nosso grupo já descreveu algumas proteínas e fenótipos relacionados com o reparo do kDNA. Para diversos agentes genotóxicos, foi comprovada que existe uma cinética de reparo distinta entre núcleo e cinetoplasto, comprovando que a célula consegue lidar com danos ao kDNA. A partir da quantificação do número de lesões no núcleo e na mitocôndria, foi demonstrado que, para danos provenientes da exposição ao peróxido de hidrogênio o número de lesões no núcleo e na mitocôndria e sua cinética de reparo são distintos (RAJÃO, 2011). Estes resultados estão na Figura 11.

Foram também colocalizadas nos sítios antipodais do parasito proteínas importantes para a resposta ao estresse oxidativo, como homólogos de MutY e OGG1, que fazem parte do sistema GO, específico para lidar com a presença de 8-oxoguanina (8oxoG) no DNA. A proteína TcOGG1, quando superexpressa, reduz os níveis de dano e de 8oxoG no kDNA do parasito (FURTADO *et al.*, 2012). Os estudos com TcMYH demonstraram que ela também se localiza nos sítios antipodais do kDNA do parasito (KUNRATH-LIMA, 2013).

Além de proteínas responsáveis por remoção de bases danificadas, nosso grupo também demonstrou a existência de diversas DNA polimerases no cinetoplasto de *T. cruzi*. A análise do genoma do parasito demonstrou que ele possui duas cópias de homólogos para a DNA polimerase κ , sendo que em uma destas cópias se encontra um possível sinal de endereçamento mitocondrial. Esta cópia foi localizada como presente nos sítios antipodais do cinetoplasto e que ela é capaz de polimerizar em intermediários semelhantes aos encontrados durante quebras de fita dupla *in vitro* (RAJÃO *et al.*, 2009). Outras duas polimerases que também foram localizadas na mitocôndria foram as polimerases β e β -PAK. Estas duas DNA polimerases estão associadas com a replicação da organela e a resposta a lesões oxidativas que surjam no kDNA. Pol β -PAK é capaz de fazer a síntese translesão frente à 8oxoG presente no kDNA, ao passo que as duas possuem atividade de DRP-liase (são capazes de limpar sítos abásicos presentes no DNA) e reduzem a quantidade de 8oxoG no kDNA de

parasitos quando superexpressas (LOPES *et al.*, 2008; SCHAMBER-REIS *et al.*, 2012).

A análise da cinética de reparo de *T. cruzi* frente à diversos agentes genotóxicos demonstrou que a cinética de reparo é dependente do tipo de dano gerado (Figura 11). Chama a atenção que, ao contrário de outros organismos, o ensaio demonstrou claramente que houve reparo no cinetoplasto de *T. cruzi* após danos gerados com cisplatina e radiação UV. Quando expostas à cisplatina, as células apresentam uma cinética similar entre o núcleo e o cinetoplasto (uma diminuição rápida no número de lesões após 1 hora). Um fenótipo semelhante (com relação à um rápido reparo) foi visto também quando as células foram tratadas com MMS: uma queda acentuada no número de lesões no núcleo e no cinetoplasto após uma hora. Porém, ao contrário do cinetoplasto, o núcleo possui um aumento no número de lesões após cinco horas, para só então seguir a dinâmica de queda (RAJÃO, 2011), o que pode sugerir que mais de uma via de reparo esteja envolvido na resolução deste dano, já que este parasito não possui a enzima AAG glicosilase, enzima do BER descrita como responsável pela resolução de danos gerados por MMS (CHEN, J. *et al.*, 1989; SOBOL *et al.*, 2000). Esta enzima se localiza na mitocôndria de mamíferos, mas ainda faltam detalhes sobre como este reparo ocorre na mitocôndria (LOON; SAMSON, 2013). Outro fato interessante foi a demonstração de que, para radiação UV existe um decréscimo nos níveis de dano nas primeiras 24 horas, uma demonstração de que, ao contrário de estudos com células humanas, *T. cruzi* consegue lidar e reparar os danos de UV gerados em seu cinetoplasto.

Estes resultados sugerem então que existem sim vias de reparo associadas ao cinetoplasto de *T. cruzi*, além de diferenças na cinética entre o reparo nuclear e mitocondrial de danos ao DNA. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho é estudar proteínas que podem estar associadas ao cinetoplasto de *T. cruzi* realizando reparo de lesões geradas no kDNA. Para tal, estudamos um gene já associado ao reparo por excisão de bases e atuante na resposta ao estresse oxidativo (TcMYH) e um gene associado com o metabolismo do DNA mitocondrial em *T. cruzi* (TcKAP7). Foram analisadas a sobrevivência e crescimento de células mutantes para estas proteínas e a cinética de reparo destes mutantes com relação à cepa selvagem. Além disso, investigamos as vias

de morte após estresse genotóxico na cepa mutante de TcKAP7, e também analisamos os fenótipos de um mutante para esta proteína em outro membro da ordem Kinetoplastida, o organismo *Angomonas deanei*.

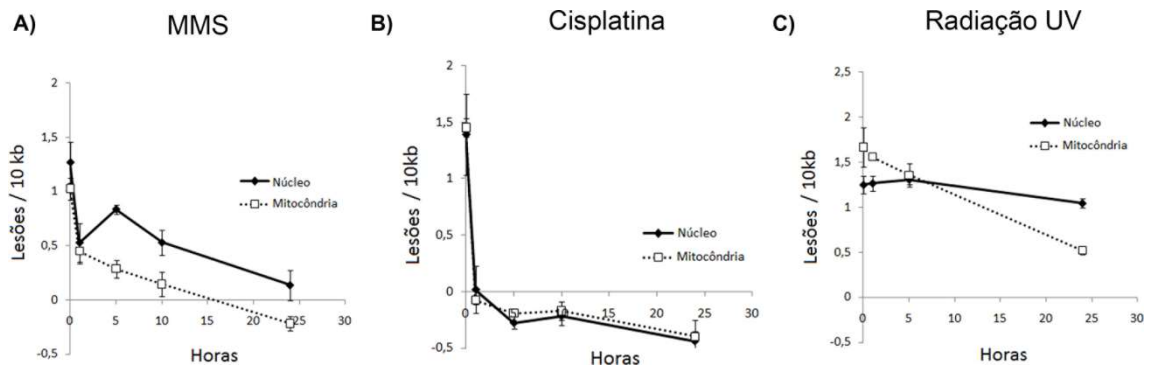


Figura 11 - Cinética de reparo de lesões no DNA nuclear e no DNA mitocondrial em *T. cruzi* – Ensaio de qPCR investigando a cinética de reparo frente à exposição por MMS (A), cisplatina (B) e radiação ultravioleta (C). Como mostrado na figura, para estes três tipos de dano, o parasito é capaz de reparar o genoma mitocondrial e nuclear, ainda que com eficiências distintas para cada um dos tratamentos (Rajão, 2011).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Identificar e caracterizar proteínas de vias de reparo que possam estar envolvidas com a manutenção do DNA mitocondrial em *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a resposta de parasitos nocaute, heminocaute e superexpressor de TcKAP7 após exposição à peróxido de hidrogênio, Mt-OX, cisplatina e radiação ultravioleta
- Caracterizar a resposta de parasitos superexpressores para o gene TcMYH após exposição à peróxido de hidrogênio e Mt-OX
- Quantificar o número de lesões por 10Kb nos parasitos após os tratamentos e determinar alterações na cinética de reparo através do ensaio de Long Range qPCR
- Investigar a cinética de expressão de TcKAP7 após tratamento com agentes genotóxicos
- Investigar o tipo de morte em células selvagens e nocaute para TcKAP7 antes e após tratamentos com agentes genotóxicos através de microscopia eletrônica de varredura
- Estudar de forma comparativa a função de AdKAP7 em *Angomonas deanei*, em células mutantes para o gene após o tratamento com agentes genotóxicos
- Quantificar o número de danos e avaliar a morfologia celular através de microscopia eletrônica de varredura nestes parasitos

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo de células

As culturas foram mantidas à 28°C por passagem regulares em meio LIT (0,5% de liver digested neutralized, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% de KCL, 0,8% de Na₂HPO₄, 20 µg.mL⁻¹, pH 7,4), esterilizado por autoclavação e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ao meio também foram acrescentados penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg.mL⁻¹) e os respectivos antibióticos de seleção.

3.2. Análise das sequências

As sequências dos genes em estudo foram recuperadas do banco de dados Trytrypdb (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) através do programa BLAST, utilizando o algoritmo BLASTp (ALTSCHUL *et al.*, 1990). A busca por domínios nestas proteínas foi feita utilizando a ferramenta online Pfam (FINN *et al.*, 2014). O alinhamento foi feito utilizando o software MultAlin (CORPET, 1988) e o software BoxShade, versão 3.21 (HOFFMAN; BARON, 1992) para destacar os domínios identificados na sequência da proteína TcKAP7. A predição de sequência mitocondrial foi feita utilizando o software MitoProt (CLAROS; VINCENS, 1996).

3.3. Análise de potencial de membrana mitocondrial

A análise de alteração de potencial de membrana foi feita a partir do ensaio de avaliação de integridade mitocondrial por DIOC₆. Culturas de células epimastigotas de *T. cruzi*, tanto da cepa selvagem quanto da cepa mutante para TcKAP7, à uma concentração de 1x10⁷ células/ml, foram centrifugadas e lavadas em PBS 1X duas vezes. Estas amostras foram ressuspensas em solução contendo DIOC₆ à uma concentração de 0,1µM e incubadas, protegidas da luz, por 10 minutos. Estas células foram então centrifugadas em baixa rotação (130g) por 5 minutos, o sobrenadante descartado e novamente ressuspensas em PBS 1X. As amostras foram então submetidas à leitura em um citômetro de fluxo. A análise foi feita utilizando o software FlowJo: Flow Cytometry Analysis Software VX 0.7 (*Tree Star, Inc*).

3.4. Tratamentos genotóxicos

Afim de investigar qualquer possível função das células com vias de reparo, foram utilizados diversos agentes genotóxicos e analisados os fenótipos destas células. Todos os experimentos abaixo foram feitos em triplicata técnica e biológica e as contagens foram feitas em uma câmara citométrica, usando corante vital eritrosina para diferenciar células vivas e mortas.

3.4.1. Tratamento com peróxido de hidrogênio

Para o tratamento com peróxido de hidrogênio, 5ml de cultura, na concentração de 1×10^7 células/ml (início da fase log de crescimento) foram tratadas com 150 μ M e 300 μ M de peróxido de hidrogênio em meio LIT (*Liver infusion-tryptose*: 5g.L⁻¹, NaCl 4g.L⁻¹, bactotriptose 5g.L⁻¹, KCl 0,4g.L⁻¹, NaH₂PO₄ 8g.L⁻¹, dextrose 2g.L⁻¹, hemin 0,2% 10ml em NaOH 0,05M) suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina e estreptomicina. As células foram deixadas em exposição por meia hora e contadas logo após isso e 24 horas depois. Quando necessário, o crescimento foi acompanhado até que as células atingissem a fase estacionária de crescimento.

3.4.2. Tratamento com Mt-OX

Afim de verificar o dano direcionado para a mitocôndria, foi utilizado o reagente Mt-OX, cedido pelo Dr. Simon Wynosvki da Universidade de Toronto, Canadá. Este reagente é um composto que possui uma molécula capaz de gerar um endoperóxido associada à um peptídeo formado por aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos de forma alternada. Este composto é capaz então de penetrar as membranas mitocondriais e causar danos de forma específica no mtDNA (WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). O tratamento das células com Mt-OX foi feito utilizando as doses 8 μ M, 16 μ M e 32 μ M, utilizando o mesmo método do tratamento com peróxido de hidrogênio e as células foram contadas logo após e acompanhadas a cada 24 horas.

3.4.3. Tratamento com metil metanossulfonato (MMS)

O tratamento com metil metanossulfonato foi feito utilizando-se 4mL de cultura de cada cepa à uma concentração de 1×10^7 células/ml, em triplicata biológica. As culturas foram cultivadas com 1,5mM e 3mM da droga em questão por 1 hora em meio LIT complementado com soro fetal bovino 10% em tubos

falcon à 28°C. Após uma hora as células foram então lavadas duas vezes, sendo ressuspensas em PBS1x estéril (PBS 10X - 0.15M KCl, pH 7,2, 0,003M KH₂PO₄, 0,092M Na₂HPO₄, 0,15M NaCl) e centrifugadas à 5.000 rpm por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em meio LIT e então colocadas em placas de 24 poços, em triplicata técnica contendo 1mL por poço. As células foram então cultivadas à 28°C e contadas nos tempos indicados nos gráficos para acompanhamento do crescimento.

3.4.4. Tratamento com berenil

O tratamento com berenil foi feito utilizando-se 5mL de cultura de cada cepa à uma concentração inicial de 1×10^7 céls/ml. Os parasitos foram expostos à 25µM e 50µM da droga por 24 horas. As células foram então distribuídas em placas de 24 poços (1mL por poço) e seu crescimento acompanhado a cada 24 horas. Os experimentos foram feitos em triplicata.

3.4.5. Tratamento com radiação UV

Para o tratamento com radiação ultravioleta, 5mL de células em fase exponencial de crescimento (1×10^7 células/ml) foram colocadas em uma camada fina sobre uma placa de Petri e expostas à luz ultravioleta, no equipamento *Stratalinker® UV Crosslinker* (Stratagene), sob as doses de 500 µJ/m², 750 µJ/m² e 1500 µJ/m². Depois de irradiadas, as células foram contadas imediatamente e cada 24h até atingirem a fase estacionária de crescimento. Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços, em triplicatas com 1mL de células por poço, e as células foram mantidas a 28°C durante o período do experimento.

3.4.6. Tratamento com cisplatina

Os ensaios de exposição à cisplatina foram feitos em placas de 24 poços. Células de cada cultura em fase exponencial de crescimento (1×10^7 células/ml) foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos. Cada cultura foi ressuspensa em PBS 1X estéril, que foram distribuídos em tubos do tipo Falcon, 5 ml por tubo. No tratamento com cisplatina, volumes suficientes de uma solução estoque dessa droga (50mM de cisplatina dissolvida em dimetilformamida) foram adicionados às células ressuspensas, de modo a obter as concentrações finais de 100µM e 150µM e 300µM desse agente. Em seguida, as células foram

incubadas por 1 hora, centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, e ressuspendidas em meio LIT suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina e estreptomicina e distribuídas em placas de 24 poços, cada poço contendo 1mL de cultura. As placas foram vedadas e incubadas a 28°C durante o período do experimento. As células vivas foram contadas imediatamente após o tratamento e a cada 24h.

3.5. Quantificação do número de danos ao DNA

3.5.1. Extração de DNA

A extração do DNA total dos parasitos foi realizada através do kit *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (Qiagen), através do protocolo adaptado para extração de DNA em tecidos, fornecido pelo fabricante. Este *kit* permite a purificação de longos fragmentos de DNA (de até 150 kb) sem o uso de fenol ou clorofórmio (que danificam o DNA), possibilitando uma posterior amplificação de longos trechos de DNA. Após a eluição do DNA, foi feita a precipitação em isopropanol incubando os tubos a -80°C por 2 horas. As amostras foram então lavadas com etanol 70 por duas vezes e então deixadas por 2 dias 4°C em 50µL de TE (1mM de EDTA pH 8,0; 10mM de Tris-HCl pH 8,0). Os DNA's foram extraídos nos tempos relativos à cada curva e que foram determinados após a análise de sobrevivência e crescimento dos parasitos.

Após a extração de DNA, as amostras tiveram suas concentrações acertadas para 3ng/µL a partir de fluorimetria. A primeira dosagem e diluição foi feita utilizando-se o espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop2000*. Em seguida, foi realizada uma dosagem precisa dessas amostras diluídas fazendo uma curva padrão com o padrão Lambda DNA/Hind III (Invitrogen), usando o corante específico para DNA dupla fita, *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay* (ThermoFisher). A leitura da curva padrão foi obtida no fluorímetro de placa *Synergy 2* (Biotek) do laboratório Multiusuários do departamento de Bioquímica e Imunologia, através da leitura dos picos de fluorescência na região do espectro entre 505 e 525nm. As amostras diluídas tiveram sua concentração corrigida – diluindo ou concentrando – de forma que a diferença de concentração entre a amostra mais concentrada e a menos concentrada fosse menor que 5%.

3.5.2. Amplificação por qPCR e análise

Para a quantificação do grau de lesões em cada uma das cepas estudadas (selvagens e modificadas) foi utilizada a técnica de qPCR a partir da detecção da progressão de uma DNA polimerase na amplificação de um fragmento longo (de cerca de 10kb) após o tratamento genotóxico. Para efeito de comparação são amplificados DNA's de cada uma das cepas tratadas e não tratadas, além de um controle interno de amplificação de um fragmento pequeno (de cerca 250pb). Os primers utilizados estão na (Tabela 1). Em CL Brener para a amplificação do fragmento nuclear longo foram utilizados os primers 1 e 2; a amplificação que corresponde ao fragmento longo da região codificadora mitocondrial foi feita com os primers 4 e 5; como se espera que a frequência de mutações em uma região pequena do DNA seja muito mais baixa que a de um fragmento longo foi utilizada uma região de 250pb para normalizar as reações, que foi amplificada com os primers 1 e 3, para o núcleo, e 4 e 6 para a mitocôndria. No caso da cepa Dm28c e de seus mutantes, foram utilizados primers específicos. Para o fragmento mitocondrial longo foram usados os iniciadores 7 e 8 e para o fragmento mitocondrial curto os iniciadores 7 e 9. No caso da análise do número de lesões em *A. deanei* foram utilizados primers para a região mitocondrial apenas. Neste caso foram usados os iniciadores 10 e 11 para o fragmento mitocondrial longo e 10 e 12 para o fragmento mitocondrial curto.

Tabela 1 - Lista de iniciadores para *T. cruzi* utilizados no trabalho

Primer	Nome	Sequência
1	QPCRNuc2F	GCACACGGCTGCGAGTGACCATTCAACTTT
2	QPCRNuc2R	CCTCGCACATTTCTACCTTCAATGCCTGC
3	QPCRNuc2Int	TCGAGCAAGCTGACACTCGATGCAACCAAAG
4	QPCRMitF	TTTTATTTGGGGGAGAACGGAGCG
5	QPCRMitR	TTGAAACTGCTTTCCCCAAACGCC
6	QPCRMitInt	CGCTCTGCCCCATAAAAAACCTT
7	Dm28cMitF	CTGAATGAAAATGCAAGTGGATAACTTATGATG
8	Dm28cMitR	CCATGTAATACCCACATAACTCGC
9	Dm28cMitI	TTT ATA TCT TAA TCC GCG CGC GC
10	AngoMitF	GAGATAGTAGGGCTTAACTTTGGGCA

11	AngoMit	GTATTTACCAGAAATCCCTCAAAAAAATCCC
12	AngoMitl	CCCATAGCTCTCTAGTGCGAAT

Todas as reações foram realizadas utilizando-se o kit *Kappa LongRange Hotstart PCR*, com as concentrações indicadas pelo fabricante. As amplificações são feitas de forma que sejam interrompidas em um número de ciclos que corresponda ao meio da fase exponencial (utilizando-se uma reação contendo 50% e 100% do DNA não-tratado como controle para a reação). São consideradas válidas reações cuja razão entre a amostra com 50% de DNA e a de 100% de DNA correspondam à uma amplificação entre 40% e 60%. O programa utilizado para a amplificação se encontra na Tabela 2. Após a amplificação, a quantificação do número de moléculas amplificadas foi feita também por fluorimetria, seguindo o mesmo protocolo já explicado anteriormente.

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

Fragmento longo			Fragmento curto		
	94	1 minuto		94	1 minuto
23 ciclos (<i>T. cruzi</i>)	94	15 segundos	22 ciclos (<i>T. cruzi</i>)	94	15 segundos
22 ciclos (<i>A. deanei</i>)	68	12 minutos	20 ciclos (<i>A. deanei</i>)	68	45 segundos
	72	10 minutos		72	10 minutos
	4	indefinidamente		4	indefinidamente

A análise do número de lesões foi feita comparando-se a amplificação dos fragmentos longos de amostras tratadas e não tratadas. Primeiramente é feita uma reação de “branco” para descontar o meio no qual os reagentes estão (uma reação sem DNA molde). Após isto os valores obtidos são normalizados de acordo com o fragmento interno de cada região sendo analisada, utilizando-se seu respectivo fragmento curto. Se obtém assim uma amplificação relativa (tratado\não-tratado) para cada cepa e condição analisada. A estimativa de número de lesões por 10kb se obtém após a aplicação da fórmula $-Ln$, já que o aparecimento de lesões no DNA segue a distribuição de Poisson. São feitas

medidas e reações em duplicata e a média destes valores é utilizada para esta estimativa. Para todos os cálculos foram montadas planilhas utilizando-se o programa *Microsoft Excel*®.

3.5.3. Quantificação do número de sítios AP no DNA total de *T. cruzi*

Para a quantificação do número de sítios AP foram utilizadas amostras de DNA total extraídas como já descrito anteriormente. DNA de culturas tratadas com 100µM de H₂O₂ foram extraídas nos tempos logo após o início do tratamento, 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 10 horas e 24 horas depois do tratamento. O número de sítios AP foi quantificado utilizando-se o kit *Abcam DNA Damage – AP sites – Assay (ab65353)* seguindo o protocolo do fabricante. O kit se baseia em um reagente chamado ARP (Aldehyde Reactive Probe) que está ligado à uma biotina. O ARP é capaz de interagir com o anel aberto de um sítio AP (resultante da atividade de liase de algumas proteínas que deixa uma pentose aberta na molécula de DNA). O DNA extraído foi exposto ao ARP, que se liga a estes sítios AP e faz a marcação indireta destes com biotina. Após isso se utiliza um ensaio de avidina-biotina, que depois é revelado, por colorimetria, utilizando o reagente HRP *developer*. A leitura do número de sítios AP foi feita no espectrômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad) a partir da leitura da OD (450nm) entre a cepa selvagem e a cepa superexpressora de TcMYH. O ensaio foi feito em triplicata biológica e técnica.

3.6. Extração de proteínas e Western Blotting

Populações de células na concentração de 1x10⁷-cél/ml foram tratados com o respectivo agente genotóxico da forma descrita acima. Um total de 1x10⁸ células foram centrifugadas após o tratamento com cada agente genotóxico nos tempos logo após o término do tratamento, 1 hora depois, 4 horas depois, 24 horas depois e 48 horas depois. As células centrifugadas, foram ressuspensas em tampão de lise 1x (100mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, 200mM de DTT) e fervidas por 5 minutos. Por fim as células sofreram lise celular por sonicação (5 ciclos de 20 segundos ON , intercalados por 5 ciclos de 20 segundos OFF) e as amostras foram guardadas à -20°C.

As amostras foram então quantificadas utilizando-se o reagente de Bradford em leitura no espectrômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad) em leitura no espectrofotômetro à 595nm. 20µL de cada amostra foi diluído em uma solução de 180µL contendo e 50µL de reagente de Bradford (Diluição 1:4). Como curva padrão foi feita uma diluição seriada de BSA de concentração conhecida de 10mg/ml à 0,625mg/ml. Após a quantificação com a curva padrão, a concentração de cada amostra foi estimada. Cada amostra foi dosada em triplicata técnica e 20µg de cada amostra foram aplicadas no gel.

As amostras foram aplicadas em um gel SDS de poli-acrilamida de 15% e a corrida foi feita a 120V por 2 horas em tampão de Tris-glicina (25 mM de Tris, 250 mM de glicina pH8,3 e 0,1% de SDS). Após a corrida o gel foi incubado em tampão de transferência (30 mM de glicina, 48 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol) e a membrana de polivinidileno (PVDF GE Healthcare Amersham) foi ativada em metanol por 3 minutos. As amostras foram então transferidas usando o aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) em um sistema semi-seco por 1 hora a 300mA. Após isso as membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó 4%, lavadas em solução de TBST 1x (150 mM NaCl, 20 mM de Tris pH 7,5 e 0,1% Tween 20) e incubadas overnight com o anticorpo primário anti-TcKAP7 (1:2000), produzido e cedido pelo professor Dr. Stênio Fragoso, ou anticorpo monoclonal anti-alpha tubulina (Invitrogen – 1:10000), ambos em solução de leite em pó 4%. Após a incubação do anticorpo primário a membrana foi novamente lavada com PBST 1x e as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-mouse Igg Sigma Immuno Chemicals) na concentração de 1:10000 por 1 hora.

3.7. Imunofluorescência

Foram coletadas aproximadamente 1×10^7 células para cada análise. Estas células foram centrifugadas e lavadas uma vez em PBS 3x. Após a lavagem, as células foram incubadas por 10 minutos em uma lâmina de 8 poços (Tekdom), previamente coberta com Poly-L-lisina (Sigma Aldrich). Os parasitos foram então fixados, por 15 min, em solução de PBS 1x contendo 4% (v/v) de para-formaldeído. Os poços foram em seguida lavados cinco vezes com PBS 1x e as lâminas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD,

contendo DAPI a 1,5 µg.ml⁻¹ (Vector Laboratories). Na sequência, as lâminas foram examinadas e as imagens capturadas, utilizando-se um microscópio de fluorescência ApoTome.2 (Zeiss). As imagens foram analisadas utilizando o software ZenBlue 2.5 (Zeiss Software) e montadas no programa *Adobe Photoshop* (Adobe Systems).

3.8. Ensaio de Anexina e Iodeto de propídeo

Após o tratamento com o respectivo agente genotóxico, 1mL de células à uma concentração inicial de 1x10⁷ células/ml foram distribuídas em microtubos de 1,5mL. Células foram então submetidas a centrifugação por 10 min a 3000 rpm e posteriormente retirado o meio de cultivo por aspiração. O pellet foi lavado duas vezes em 500 µL de meio PBS estéril, por 10 min a 3000 rpm para cada lavagem. O pellet foi suspenso em 100 µL de tampão de reação (*Thermo Scientific*®), transferidos para tubos específicos para citômetro e adicionado 1 µL de anexina V e 1 µL de iodeto de propídeo. Os tubos foram armazenados por 10 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente foi pipetado 400 µL do mesmo tampão de reação e efetuado a leitura em citômetro. Os dados foram analisados no software FlowJo: Flow Cytometry Analysis Software VX 0.7 (*Tree Star, Inc*).

3.9. Microscopia eletrônica de varredura

Os parasitos foram fixados em glutaraldeído tipo II (Sigma) 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 e depositados em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina. As amostras foram então lavadas em PBS, pH 7,2 e pós-fixadas por 1h em solução contendo tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas em água, desidratadas em graus crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 2x 100% - por 10 minutos em cada etapa). A secagem foi feita no aparelho de ponto crítico Leica EM CPD030, evitando-se assim a deformação da amostra pelo efeito da tensão superficial. As lamínulas contendo as células foram aderidas em porta-objetos de alumínio através de uma fita de carbono. Em seguida, as amostras foram metalizadas através do recobrimento com ouro no equipamento Balzers FL9496 e então observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Quanta 250 FEI Company) operando a 15 kV.

3.10. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism v7.04 (GraphPad Softwares, Inc.). Nas análises das curvas de sobrevivência e de crescimento foi utilizado o teste T não-pareado, ponto a ponto, assumindo distribuição normal e variância igual. A sobrevivência foi calculada considerando como 100% o número de células de uma determinada cepa sem tratamento e comparando o valor do número de células daquela mesma cepa após tratamento. O mesmo teste também foi utilizado na comparação de pontos dos resultados da análise de qPCR, com a comparação sendo feita entre as células mutantes e seus respectivos controles. Os gráficos são de um experimento representativo e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de uma triplicata técnica.

4. Resultados

4.1. TcMYH

4.1.1. Análise da sequência

A proteína TcMYH (o homólogo de MutY em *Trypanosoma cruzi*), teve sua sequência e estrutura analisada em busca de pistas sobre sua função celular. A busca por domínios na sequência de TcMYH, revelou a presença de dois domínios principais de TcMYH: o domínio HhH GPD da superfamília do BER; o domínio NUDIX, que é característico de algumas hidrolases e glicosilases, também característico de determinadas proteínas envolvidas com o reparo de DNA (Figura 12). Dentro do domínio HhH GPD, os motivos identificados são todos característicos de proteínas de reparo de DNA relacionados com a geração, identificação ou metabolismo de sítiosapurínicos e apirimidínicos (AP) na molécula de DNA, como os motivos Endo3c (condizente com a função esperada de TcMYH) e os motivos hélice-grampo-hélice, presente em algumas proteínas de reparo e que auxiliam na ligação do DNA.



Figura 12 - Sequência de TcMYH e seus domínios – Sequência do alelo Esmeraldo de TcMYH está apresentada na figura. Não foi possível analisar a sequência do alelo Não-Esmeraldo de TcMYH pois faltam informações sobre a porção N-terminal da

proteína, impossibilitando a localização dos domínios. Em verde: o principal domínio da proteína TcMYH (HhH GPD da superfamília do BER); em vermelho: domínio NUDIX, característicos de hidrolases e glicosilases envolvidas com o BER.

Durante a caracterização desta proteína já foi descrito que sua localização é ubíqua e compreende tanto o núcleo quanto o cinetoplasto da célula (KUNRATH-LIMA, 2013). Porém, não foram encontradas sequências de localização mitocondrial clássicas na análise da sequência de TcMYH. Utilizando os softwares MITOPROT e MitoFates, não se obtém nenhuma predição significativa de localização mitocondrial para a proteína (com valores de predição sendo de 50,13% e 13,2% respectivamente). Além de TcMYH, nosso grupo já descreveu diversas proteínas que atuam na mitocôndria de *T. cruzi*. Ainda que nos trabalhos tenha sido demonstrada a presença destas proteínas no cinetoplasto de *T. cruzi*, não existe uma região consenso entre todas estas proteínas identificada pelos softwares como sendo a sequência de localização mitocondrial. Analisando a sequência dos genes Polk (RAJAO, *et al*, 2009), Pol β , Pol β -PAK (LOPES, *et al* 2008), TcKAP7 (tanto da cepa CL Brener e da cepa Dm28c), TcMYH e TcOGG1 (FURTADO, *et al*, 2012), o software MITOPROT identifica apenas nas proteínas Polk, e TcKAP7 (para as duas cepas) um fragmento que poderia ser o sítio de endereçamento mitocondrial. A comparação da região entre estas três proteínas, porém, não demonstra nenhuma conservação aparente (Figura 13). Isto poderia ser um indício de que os sinais clássicos de localização mitocondrial em outros organismos talvez não sejam os mesmos para *T. cruzi* ou que possa existir algum tipo de conformação tridimensional que direcione estas proteínas à mitocôndria.

Kappa	1	MQR W ARVSPAVF HRR -----
TcKap7 (CLBrener)	1	MLR T VLP PH NSRKLALR FF QTEQRK-----
TcKap7 (Dm28c)	1	MRLQ L L L IF F S L FF L L L FFWGGGSLVCGWMDGRIQT N ATKNNNKKGLRRRTRRGK

Figura 13 - Alinhamento de possíveis sequências de endereçamento em proteínas de *T. cruzi* – Alinhamento predito de possíveis sequências de endereçamento mitocondrial de três proteínas de cepas distintas de *T. cruzi*. A proteína Kappa já foi descrita na mitocôndria de *T. cruzi* (RAJÃO *et al.*, 2009) assim com a proteína TcKap7 da cepa Dm28c (MORINI, 2015). Não existe conservação aparente na sequência de proteínas distintas direcionadas ao cinetoplasto de *T. cruzi* indicando que outros mecanismos podem controlar este processo no parasito.

4.1.2. Resposta ao estresse oxidativo

Já foi demonstrado por nosso grupo que cepas superexpressoras para o gene TcMYH possuem fenótipo de maior sensibilidade à agentes geradores de estresse oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (KUNRATH-LIMA, 2013). Também foi descrito neste mesmo trabalho TcMYH não se localiza restritamente no núcleo e, por isso, utilizamos o reagente Mt-OX para investigar um possível papel de TcMYH no cinetoplasto de *T. cruzi*. O gráfico da Figura 14 demonstra que, dependendo da dose analisada, a cepa superexpressora realmente possui um fenótipo de maior sensibilidade quando comparado com a cepa selvagem. Este fenótipo não é visto com o aumento da dose do reagente, indicando que existe a possibilidade de existir um limite para o número de lesões gerados na mitocôndria de *T. cruzi*. Nosso próximo passo foi então investigar qual a extensão dos danos gerados pelo reagente nesta cepa a partir do ensaio de qPCR de fragmento longo e da quantificação do número de sítios AP no DNA total do parasito.

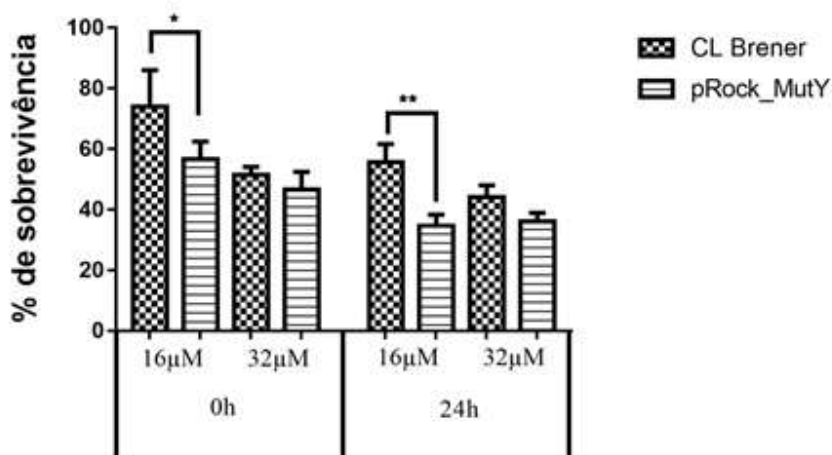


Figura 14 - Sobrevivência de TcMYH ao Mt-OX – Curva de sobrevivência da cepa superexpressora de TcMYH e da cepa selvagem CL Brener ao reagente Mt-OX. A sobrevivência foi calculada logo após o fim do tratamento de 30 minutos e após 24 horas do término do tratamento. A cepa superexpressora de TcMYH possui uma sobrevivência menor à dose de 16µM de Mt-OX nos dois tempos analisados quando comparada com a sobrevivência da cepa CL Brener. Não existe diferença entre a sobrevivência das duas cepas, nos dois tempos analisados após o tratamento com a dose de 32µM do reagente. (*p<0,05 **p<0,01, teste t student)

4.1.3. Quantificação dos danos ao DNA

A proteína MutY é uma glicosilase bifuncional, capaz de gerar um sítio AP após o reconhecimento do pareamento errado entre uma 8-oxoG:A (MICHAELS; MILLER, 1992). Para determinar se esta maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio poderia estar relacionada com um maior número de sítios AP no DNA de *T. cruzi*, foi feita a quantificação utilizando-se o kit Abcam DNA Damage AP sites Assay, como descrito anteriormente.

Após a leitura da placa em um espectrofotômetro, foi feita a quantificação relativa dos danos ao DNA da cepa superexpressora de TcMYH em comparação com o controle selvagem. Como mostrado na Figura 15, logo após o tratamento, e nos tempos de 30 minutos, 6 horas, 10 horas e 24 horas após à exposição, o número de sítios AP presentes no DNA da cepa superexpressora é maior que o controle selvagem. Esta cepa apresenta também um pico no número de sítios AP após os primeiros 30 minutos de exposição, ao passo que o pico para cepa selvagem é de 1 hora após à exposição ao agente genotóxico.

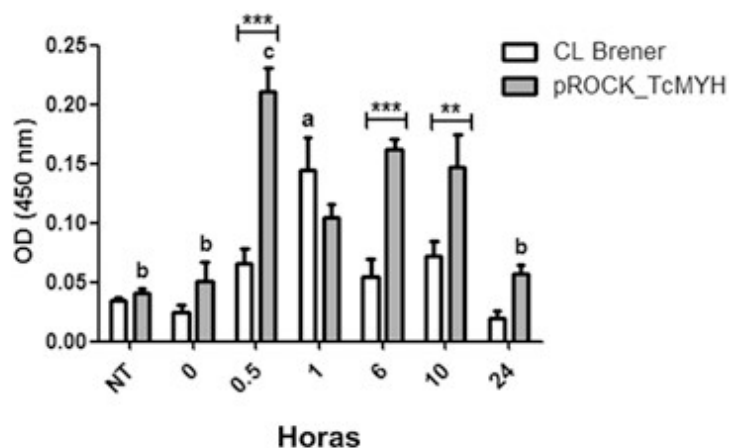


Figura 15 Quantificação do número de sítios AP no DNA total da cepa TcMYH - Quantificação do número de sítios AP gerados na cepa superexpressora de TcMYH após exposição à 100µM de peróxido de hidrogênio. Em todos os tempos analisados, excetuando-se 1 hora após a exposição, a cepa superexpressora possui níveis maiores de sítios AP que a cepa selvagem CL Brener. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001, One-Way ANOVA com correção de Bonferroni; a= todos os pontos tempos de CL Brener são estatisticamente diferentes deste tempo; b = os pontos de 0,5h, 1h, 6h e 10h são estatisticamente diferentes destes pontos para o superexpressor; c = todos os pontos de

tempo, com exceção dos pontos de 6 e 10, são estatisticamente diferentes deste ponto para a cepa superexpressora)

Estes resultados sugerem que a superexpressão da proteína está causando a geração de mais sítios AP no DNA do parasito, podendo causar um desbalanço da via de reparo associada (BER). O mesmo fenótipo foi observado após a realização do ensaio de qPCR para quantificar as lesões no DNA de *T. cruzi*. Neste ensaio as cepas foram expostas à 100µM de peróxido de hidrogênio e o DNA foi extraído, como já descrito, para recuperar fragmentos longos. Após isto foram utilizados os iniciadores específicos para cada região dos fragmentos longos nuclear e mitocondrial, também já descritos.

Como demonstrado na Figura 16, a cepa superexpressora do gene TcMYH possui um maior número de lesões tanto no núcleo quanto na mitocôndria, quando comparado com a cepa selvagem CL Brener. Apesar da persistência do número de lesões ser aparente tanto no DNA nuclear quanto no kDNA, o efeito é mais destacado e mais claro no núcleo do parasito.

A quantificação dos danos por qPCR de fragmento longo demonstrou que no núcleo é bem clara a diferença nos níveis de dano entre a cepa superexpressora e a cepa selvagem. A análise dos níveis de lesão no DNA mitocondrial demonstrou uma cinética distinta entre a mitocôndria e o núcleo. Enquanto foi possível observar a presença de até 1,8 lesões/10kb e 1,6 lesões/10kb no núcleo respectivamente do superexpressor de TcMYH e da cepa selvagem logo após o término do tratamento, a mitocôndria não apresentou uma variação tão grande nos níveis de lesões. Tanto para o superexpressor quanto para a cepa selvagem, os níveis ficaram entre 0,5 lesões/10kb e 0,8 lesões/10kb. A maior diferença encontrada entre as cepas foi no tempo de 30 minutos após o tratamento, no qual o nível de lesões do superexpressor se aproximou de 1 lesão/10kb. Importante ressaltar que o pico de meia hora é condizente com o maior pico encontrado na quantificação dos sítios AP da figura 15.

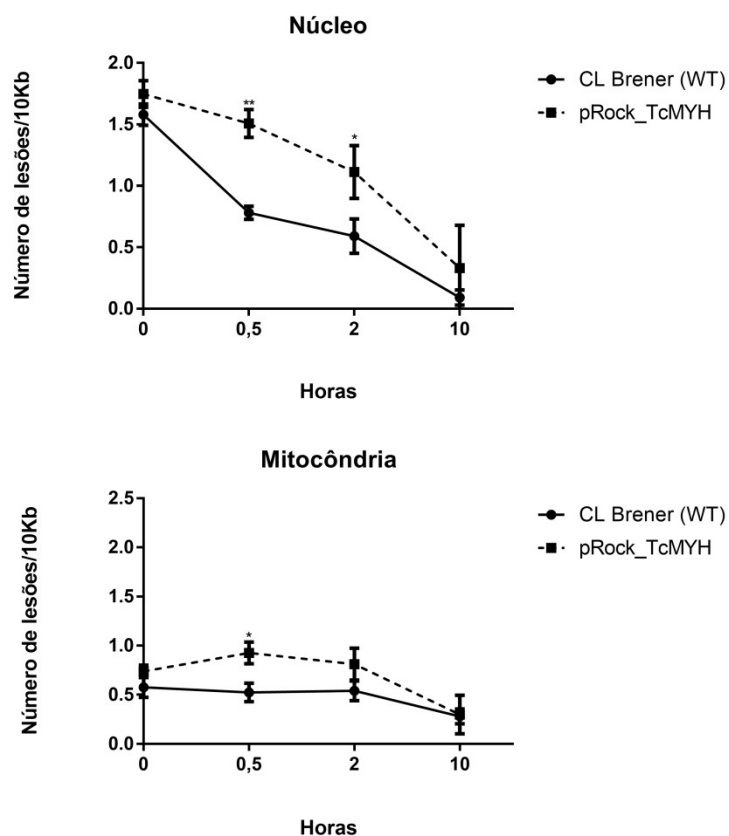


Figura 16 – Quantificação no número de lesões após exposição à 100 μ M de peróxido de hidrogênio - Quantificação do número de lesões por qPCR de fragmento longo presente nas cepas superexpressora de TcMYH e selvagem após tratamento. No núcleo o número de lesões encontradas é maior nos tempos 0,5h e 2h após o tratamento para a cepa superexpressora, em relação à cepa selvagem. Apenas no tempo de 0,5h foi vista diferença no número de lesões mitocondrias entre as duas cepas. (* $p < 0,05$, teste t student)

Juntos estes resultados indicam que TcMYH é uma enzima que atua na resposta contra o estresse oxidativo em *T. cruzi*. Esta enzima atua na manutenção tanto do DNA mitocondrial quando do DNA genômico. TcKAP7

4.2. TcKAP7

4.2.1. Análise da sequência e confirmação dos mutantes

As proteínas associadas ao cinetoplasto estão envolvidas com diversas funções relacionadas ao kDNA dos tripanossomatídeos. A proteína TcKAP7 não

possui função ainda estabelecida e, portanto, analisamos a sequência e os domínios desta proteína.

A sequência de TcKAP7 já foi identificada e analisada em outro trabalho (MORINI, 2015). Porém nenhuma análise em busca de domínios foi feita para esta sequência. A busca por similaridade revelou a presença de um domínio HMG na sequência da proteína (em verde na figura 17). Nota-se que a proteína TcKAP7 da cepa Dm28c possui semelhança maior com o alelo Não-Esmeraldo da cepa CL Brener. Os domínios HMG (do inglês *High mobility group*) são domínios comumente encontrados em proteínas que se associam à DNA e RNA (LAUDET; STEHELIN; CLEVERS, 1993). A presença do mesmo na sequência de TcKAP7 pode indicar uma função desta proteína no metabolismo de DNA.

Condizente com a localização já descrita para a proteína no cinetoplasto de *T. cruzi*, o software MITOPROT foi capaz de prever a probabilidade de localização mitocondrial de TcKAP7 como sendo de 93,09% (destacado na figura 17). A sequência, porém, não foi encontrada nos genes de outras cepas, a não ser no alelo Esmeraldo da cepa CL Brener, apesar da semelhança entre a sequência inicial da proteína de todas as cepas alinhadas. Durante a caracterização inicial de TcKAP7 foi feita uma cepa superexpressora da proteína carregando uma marcação FLAG e a detecção em microscopia de fluorescência desta versão modificada de TcKAP7 demonstrou que a proteína se localiza nos sítios antipodais de *T. cruzi*.

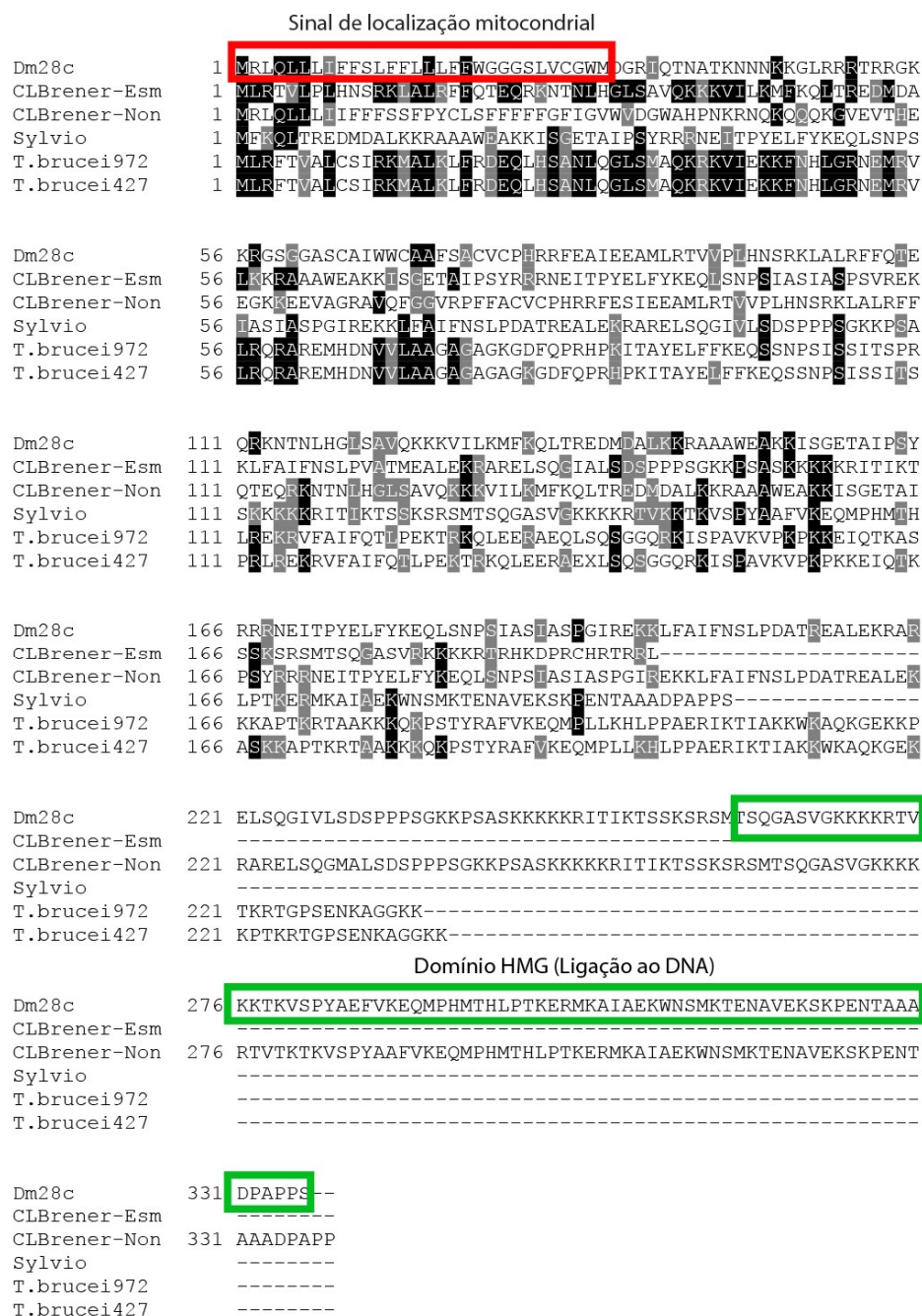


Figura 17 - Alinhamento da proteína TcKAP7 em cepas distintas de *T. cruzi* e *T. brucei*– A figura mostra o alinhamento de TcKAP7 das principais cepas de *T. cruzi* e de duas linhagens de seu grupo próximo *T. brucei*. Em vermelho se destaca o sinal de localização mitocondrial predito utilizando-se o programa MITOPROT. Em verde se destaca a posição do domínio de ligação ao DNA HMG

A confirmação do nocaute de TcKAP7 e da superexpressão da forma marcada com FLAG foi feita a partir de *western blot* com anticorpo produzido e cedido pelo professor Dr. Stênio Garcia. Como demonstrado na figura 18, a

detecção com este anticorpo específico comprova que o nocaute eliminou toda a expressão do gene na cepa mutante, assim como mostra que esta proteína é expressa na cepa selvagem. Foi também confirmado que a cepa superexpressora marcada com FLAG apresenta as duas bandas esperadas, indicando a presença tanto da proteína nativa, quanto da forma modificada de tamanho maior que a versão selvagem. Já foi demonstrado, por microscopia eletrônica, que o nocaute de TcKAP7 não afetou a estrutura mitocondrial e que esta proteína possui localização exclusivamente mitocondrial, nos sítios antipodais do cinetoplasto do parasito (MORINI, 2015). Dado o domínio de ligação ao DNA, e à localização descrita nos sítios antipodais do parasito, células superexpressoras, heminocautes e nocautes para TcKAP7 foram expostas à diversos agentes genotóxicos.

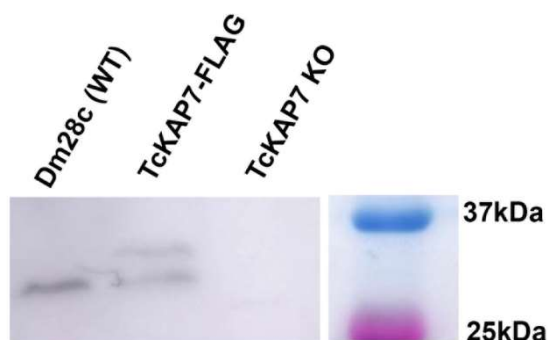


Figura 18 - Nocaute de TcKAP7 – A) Western blot confirmando a clonagem da versão marcada com FLAG de TcKAP7 e o nocaute da proteína na célula mutante. **B)** Ensaio com DIOC₆ demonstrando que o nocaute da proteína apenas não altera o potencial de membrana mitocondrial do parasito.

4.2.2. Exposição ao MMS

Apesar de nenhum fenótipo claro ser descrito em parasitos de *T. cruzi* mutantes para TcKAP3, também uma proteína associada ao cinetoplasto (SOUZA, FLAVIA SÁ PEREIRA DE *et al.*, 2010), já foi descrito que, em *T. brucei*, TcKAP6 está envolvida no metabolismo do kDNA, em funções associadas a correta replicação do mesmo (WANG, JIANYANG *et al.*, 2014). A presença do domínio de ligação ao DNA, a localização exclusiva no kDNA do parasito e a descrição de que a ausência de algumas proteínas desta família gera problemas

de replicação nos fez investigar o fenótipo dos mutantes de *T. cruzi* para TcKAP7 frente a fontes de danos ao DNA que causam problemas de replicação.

O metilmetanossulfonato (MMS) é um agente genotóxico capaz de causar a modificação de adeninas e guaninas. Em contato com o DNA, o MMS causa basicamente dois tipos de lesões: a formação de 7-metilguanina e 3-metiladenina, sendo a primeira a mais comum das modificações, correspondendo à 82% do total de lesões geradas pelo MMS (FU; CALVO; SAMSON, 2012). Esta lesão é capaz de sofrer depurinação em uma reação catalisada pela enzima AAG DNA glicosilase, sendo uma lesão reparada pelo BER na maioria dos organismos, gerando sítios abásicos que são mutagênicos e têm uma alta capacidade de causar parada de replicação (FU; CALVO; SAMSON, 2012; O'CONNOR; LAVAL, 1991).

Afim de investigar se TcKAP7 poderia estar envolvida com a resposta ao MMS em *T. cruzi* parasitos duplo nocaute para o gene foram expostos à 1,5mM da droga por 60 minutos - tempo de exposição já descrito como capaz de causar danos ao DNA mitocondrial e nuclear de *T. cruzi* (RAJÃO, 2011) - e tiveram seu crescimento acompanhado. Como demonstrado na figura 19, não houve diferença de crescimento entre os parasitos duplo nocaute e a cepa selvagem controle, indicando que TcKAP7 não está envolvido nos problemas causados pela droga. Para ambas as cepas, houve um atraso no crescimento nas primeiras 24 horas após tratamento e, após este tempo, ambas as células foram capazes de retomar o crescimento de forma semelhante.

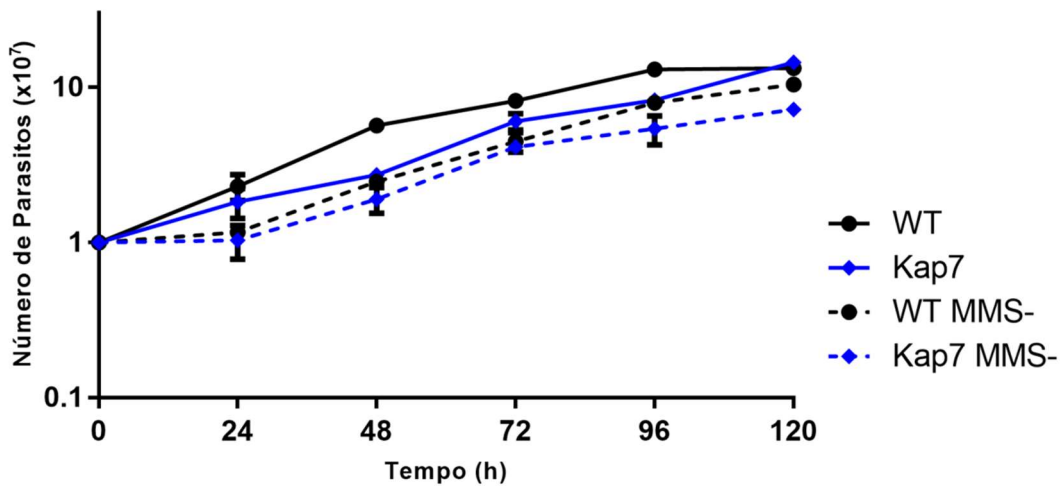


Figura 19 – Curva de crescimento após tratamento com 1,5mM de MMS – Crescimento das células após tratamento por 60 minutos com 1,5mM de MMS. Não existe diferença significativa na sensibilidade entre a célula nocaute para TcKAP7 e o controle selvagem.

Apesar do crescimento semelhante que ambas as cepas apresentam após o tratamento com MMS, também determinamos se a morte inicial após o tratamento é distinta para as duas cepas. Como demonstrado na Figura 20, não existe diferença significativa na morte imediata (após 1 hora de tratamento). Estes resultados demonstram que TcKAP7 não está envolvido na resposta à danos causados por MMS.

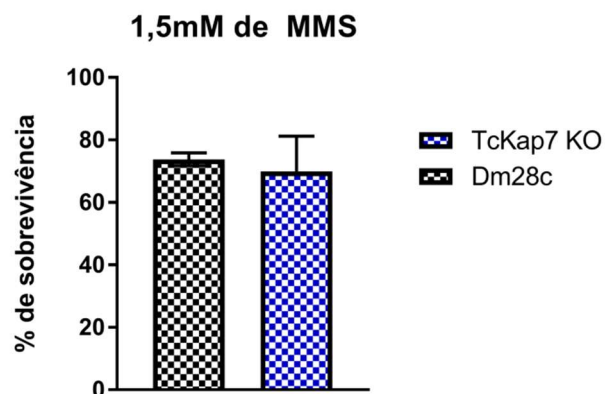


Figura 20 – Sobrevivência de células TcKAP7KO e células selvagens após tratamento com MMS – Células da cepa selvagem e da cepa mutante para TcKAP7 foram tratadas como anteriormente com 1,5mM de MMS e o crescimento foi contado após o fim do tratamento. A sobrevivência foi calculada em

comparação com células não tratadas sendo consideradas como 100%. Não existe diferença estatisticamente significativa na sobrevivência entre as duas cepas testadas.

4.2.3. Exposição à berenil

Apesar de ser fonte de problemas de replicação, o MMS não possui especificidade para nenhum dos dois genomas do parasito e é capaz de atingir tanto o DNA nuclear quanto o DNA do cinetoplasto (RAJÃO, 2011). Visando tentar eliminar efeitos causados por danos gerados no DNA nuclear de mutantes para TcKAP7 e investigar o efeito de problemas de replicação no cinetoplasto do parasito, foi utilizado o berenil. Esta droga é parte de uma classe de moléculas que são capazes de se ligar ao sulco menor da dupla fita de DNA, causando problemas de replicação. Em tripanossomatídeos já foi descrito que esta droga é inibidora da topoisomerase II (SHAPIRO, 1990) e em *T. cruzi* foi demonstrado que esta droga atua de forma exclusivamente mitocondrial e que, após tratamento com 50µM de berenil, ocorre desorganização do kDNA e problemas de replicação (ZUMA *et al.*, 2014). Devido à especificidade mitocondrial e afim de investigar se TcKAP7 estaria envolvida em problemas de replicação mitocondrial, nós expusemos parasitos selvagem e nocautes a doses distintas de berenil.

Como demonstrado na figura 21A e 21B, não houve diferença significativa no crescimento entre a cepa nocaute e a cepa controle quando tratadas com as duas doses de berenil. Além disso, é descrito que um dos fenótipos causados pelo tratamento com berenil é a presença de parasitos sem cinetoplasto (também denominados dK, do inglês *dyskinetoplasic*), devido à progressão do ciclo apesar dos problemas de replicação mitocondrial (ZUMA *et al.*, 2014).

Afim de investigar este fenótipo, amostras foram retiradas das curvas e fixadas em PFA 4% por 7 minutos. Depois estas células foram depositadas sobre lâminas de vidro e coradas com DAPI para evidenciar o material genético dos parasitas. A contagem do número de parasitos dK foi feita em relação ao controle não tratado. Como demonstrado na Figura 21C, não houve diferença no número de parasitos dK tanto após 24h, quanto após 72h de tratamento com berenil.

Este resultado indica que, apesar de atingir um número de células mais baixo em seu platô de crescimento, TcKAP7 não está envolvida com o metabolismo de problemas de replicação no kDNA de *T. cruzi*.

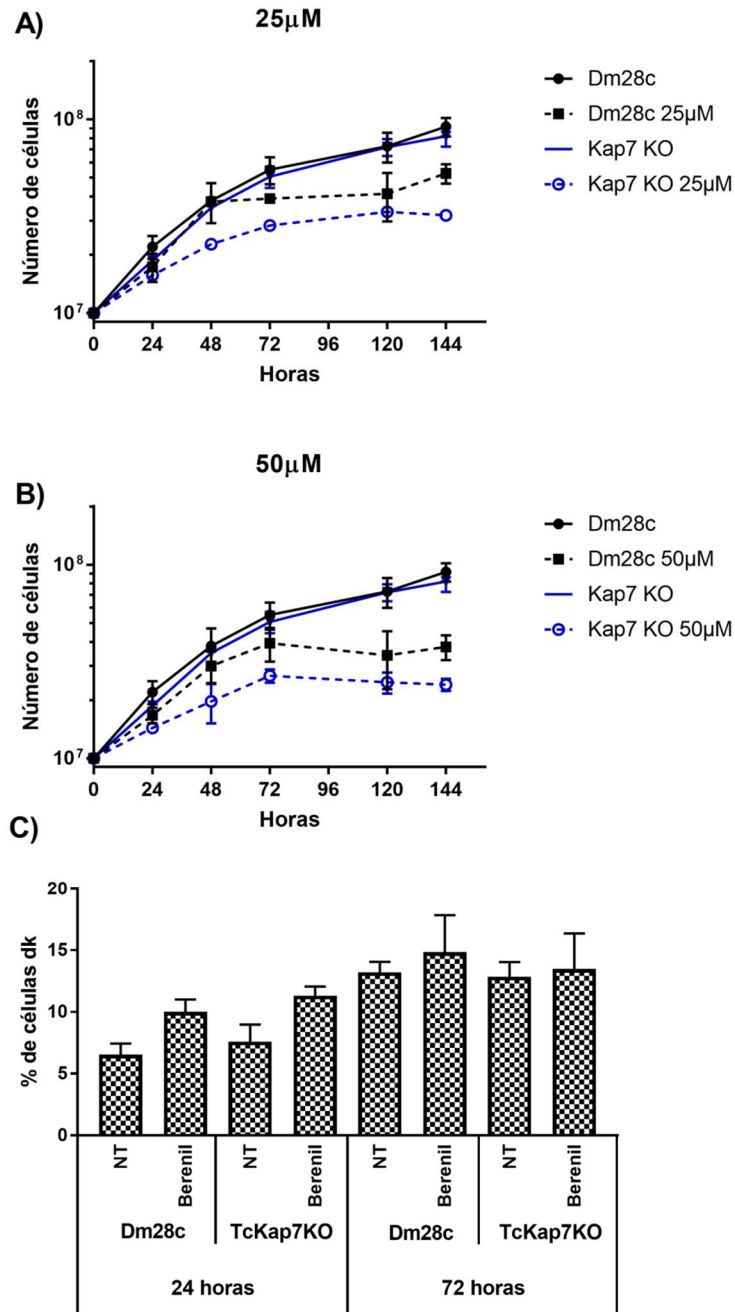


Figura 21 - Curvas de crescimento após tratamento com doses diferentes de berenil – A) Curva de crescimento após tratamento com 25 μM de berenil. **B)** Curva de crescimento após tratamento com 50 μM de berenil. Em ambos os tratamentos as duas cepas testadas não apresentaram diferença significativa na cinética de crescimento

quando comparadas uma com a outra. **C)** Porcentagem de células sem cinetoplasto (dK) nas células selvagem e mutantes após tratamento com 50uM de berenil. Não existe diferença entre o número de células dK entre as duas linhagens.

4.2.4. Exposição à peróxido de hidrogênio e ao reagente Mt-OX

Em busca de tentar elucidar se TcKAP7 possui algum papel na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi*, uma importante fonte de danos no ciclo de vida do parasito, células nocaute para o gene TcKAP7 e selvagens foram expostas a concentrações crescentes de H₂O₂ e sua sobrevivência calculada (Figura 22). Não houve alteração significativa na sobrevivência imediata ao peróxido de hidrogênio para as células heminocautes para o gene TcKAP7. Porém, a cepa duplo nocaute para o gene possui uma maior resistência à dose mais alta de peróxido de hidrogênio testada. O gene TcKAP7 pode, então, estar relacionado com a resposta ao estresse oxidativo em *Trypanosoma cruzi*.

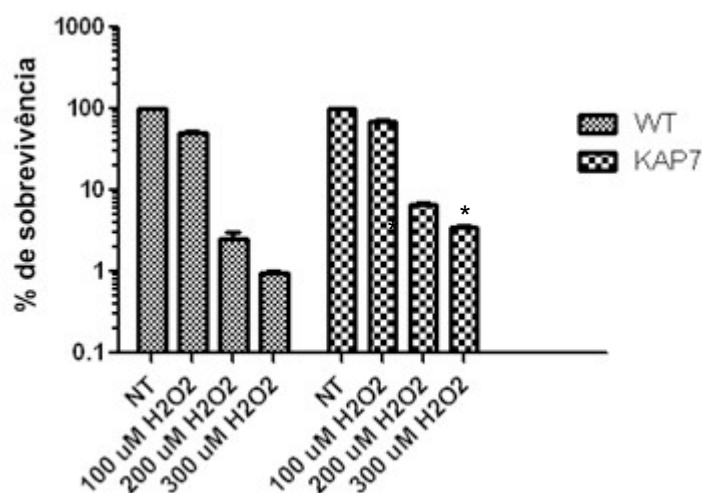


Figura 22 - Sobrevivência à peróxido de hidrogênio da cepa TcKAP7 KO

– Células foram expostas à diferentes doses de peróxido de hidrogênio e sua sobrevivência foi calculada após 72 horas. A cepa nocaute de TcKAP7 apresentou fenótipo de maior resistência apenas nas doses mais altas testadas, quando em comparação com a cepa controle Dm28c selvagem. (*p<0,05, teste t student)

Uma das limitações do uso de agentes genotóxicos e está no tipo de dano gerado por eles. Como já descrito, determinados agentes apresentam um amplo espectro de danos e modificações que causam em macromoléculas,

impossibilitando a separação das causas e de seus efeitos numa análise fenotípica. O peróxido de hidrogênio não possui preferência ou especificidade entre o DNA nuclear e o mtDNA. Tentando contornar esta possível limitação foi utilizado o reagente Mt-OX (Figura 23). A estrutura do reagente está representada na Figura 23 A. Quando expostas ao reagente, a célula duplo nocaute para TcKAP7 também apresentou uma maior resistência à dose maior testada (Figura 23 B), porém esta resistência foi evidente apenas logo após o tratamento. Estes resultados podem sugerir que a proteína TcKAP7 possui algum papel na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi*.

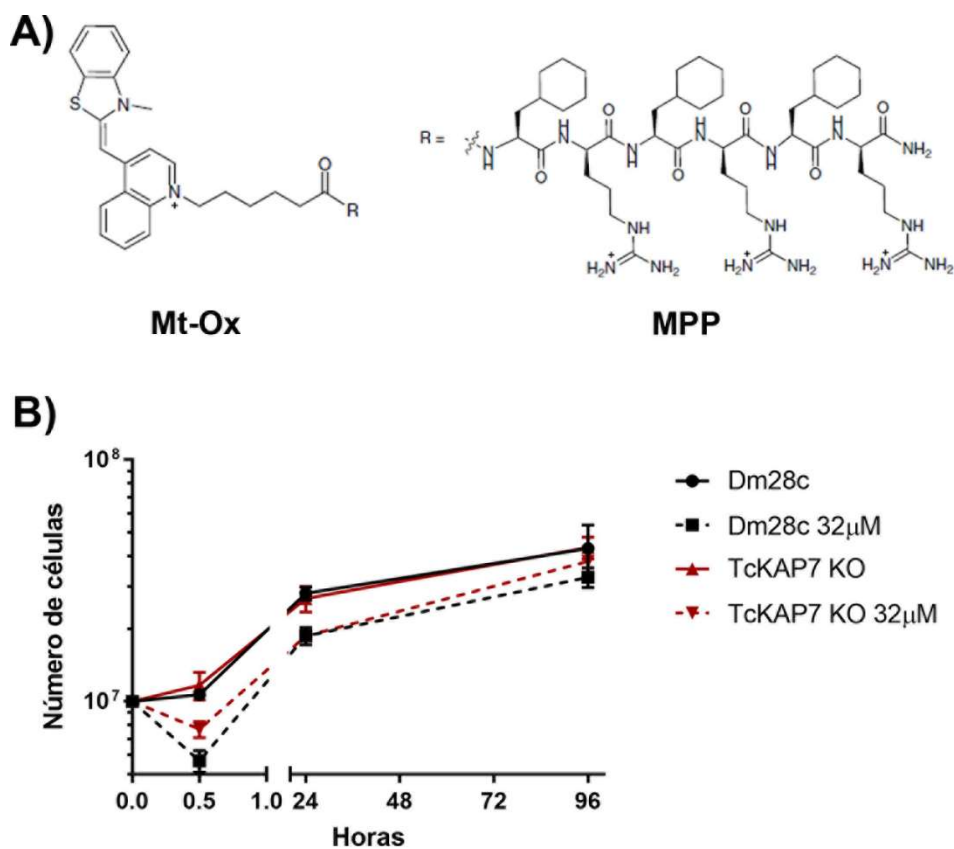


Figura 23 - Sobrevivência da cepa TcKAP7 KO ao Mt-OX – A) Estrutura do Mt-OX (à esquerda) e do peptídeo de direcionamento à mitocôndria (à direita) (Modificado de Wisnovsky 2016). **B)** As células foram expostas à 16µM e 32 µM como descrito anteriormente nos materiais e métodos. Como mostrado na figura apenas 0,5h após o tratamento foi possível observar a resistência da cepa nocaute ao reagente (*p<0,05, teste t student)

4.2.5. Exposição à cisplatina

Como já foi dito, a cisplatina é capaz de gerar danos na molécula de DNA que são reparados, majoritariamente, pelo NER. Visando investigar se a proteína TcKAP7 possui algum envolvimento no reparo destes danos, foi investigado o fenótipo de crescimento após tratamento com cisplatina das cepas superexpressora para TcKAP7, heminocaute para a proteína e duplo nocaute. (Figura 24).

Os gráficos demonstram que a superexpressão da proteína não parece afetar a resposta à cisplatina nas três doses e em todos os tempos testados. Não existe diferença na sobrevivência logo após à exposição à cisplatina nas doses testadas e nem o crescimento destas células foi afetado pela droga (em azul na figura 24). O mesmo fenótipo foi observado para as células heminocaute (em vermelho na figura 24). Para o duplo nocaute para a proteína TcKAP7, porém, em todas as doses testadas, houve uma diferença significativa no fenótipo em comparação com a célula WT (em verde na figura 24). Após a exposição das células à cisplatina, a cepa duplo nocaute apresentou um atraso no crescimento em comparação com as outras (em verde na figura 24) para todas as doses testadas.

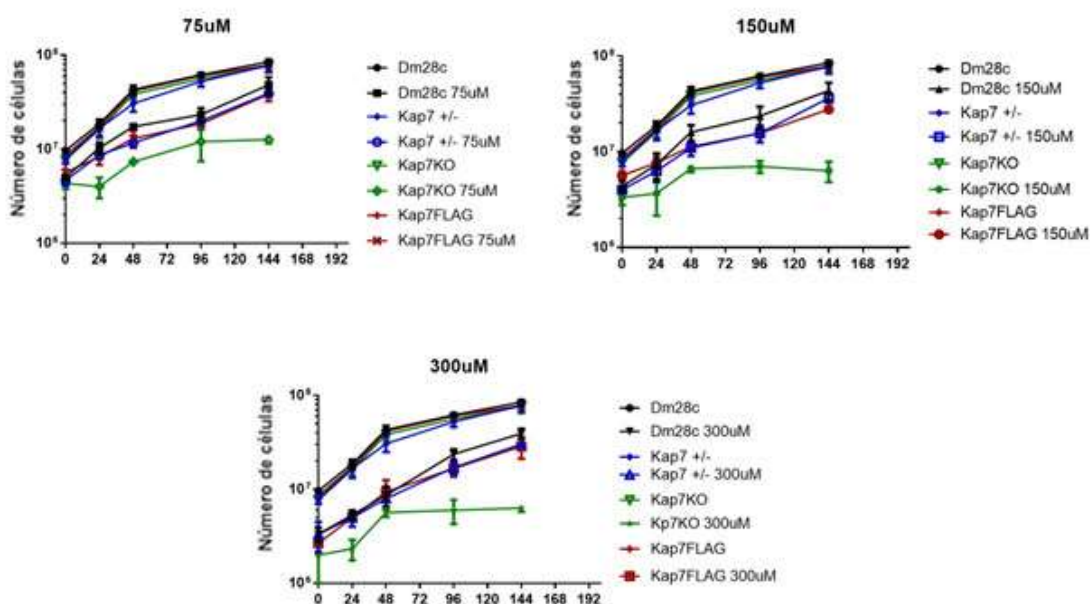


Figura 24 - Curva de crescimento de parasitos superexpressor, heminocaute e duplo nocaute na presença de cisplatina – A resposta de cada um dos parasitos modificados para TcKAP7 na presença de 75µM, 150µM e 300µM de cisplatina. As cepas heminocaute e superexpressora

(respectivamente azul e vermelho) não possuem fenótipo claro quando comparado com a cepa selvagem Dm28c (em preto).

A taxa de sobrevivência no primeiro momento (15 minutos após o término do tratamento da célula) também foi avaliada para a célula duplo nocaute. Como demonstrado na Figura 25, o mutante de TcKAP7 apresenta uma sobrevivência menor em comparação com a sobrevivência observada na célula controle nas duas doses testadas. Na maior dose a porcentagem de sobrevivência da célula mutante foi de 22,8% contra 34,7% da célula selvagem. Este fenótipo poderia indicar um possível envolvimento de TcKAP7 com o metabolismo e o reparo de DNA na mitocôndria de *T. cruzi*.

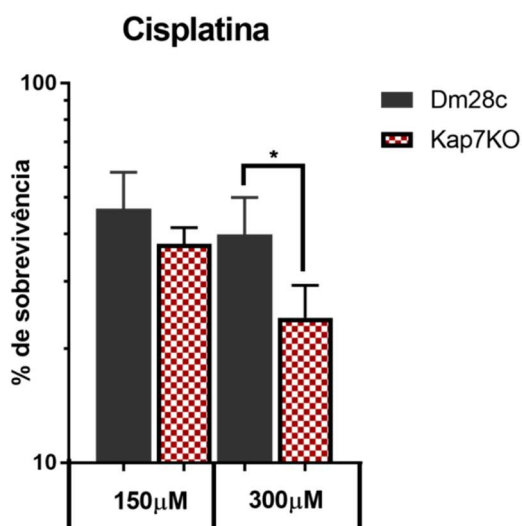


Figura 25 – Sobrevivência após tratamento com cisplatina – Sobrevivência das células selvagem e mutante à cisplatina foi medida nas duas maiores doses testadas anteriormente. O mutante para TcKAP7 foi mais sensível em ambas as doses testadas, porém a diferença estatística foi observada apenas na dose maior. (* $p < 0,05$, teste t student)

4.2.6. Exposição à radiação ultravioleta

Outra importante fonte de danos que é capaz de ativar a via de reparo por excisão de nucleotídeos é a radiação ultravioleta (HANAWALT; SPIVAK, 2008). Dentre seus danos gerados, os principais (CPD e 6-4PP) são capazes de causar

grandes distorções nas hélices da molécula de DNA e ativar a via do NER. Em busca da função de TcKAP7, as células mutantes para esta proteína foram expostas à radiação ultravioleta e o fenótipo analisado (figura 26). Para a radiação UV, nas doses mais baixas testadas (500 J/m² e 750 J/m²) não verificamos alteração significativa no fenótipo de nenhuma das cepas modificadas em comparação com o controle selvagem. Na dose mais alta, porém, a célula duplo nocaute apresentou uma alteração no crescimento. Como mostrado na Figura 26, a cepa duplo nocaute para o gene TcKAP7 apresenta uma maior morte com o passar do tempo quando comparada com a cepa selvagem, cujo crescimento se mantém parado. Este resultado pode indicar que TcKAP7 pode estar envolvido com o reparo de DNA de *Trypanosoma cruzi*, de uma maneira que pode ou não estar relacionada com o reparo por excisão de nucleotídeos.

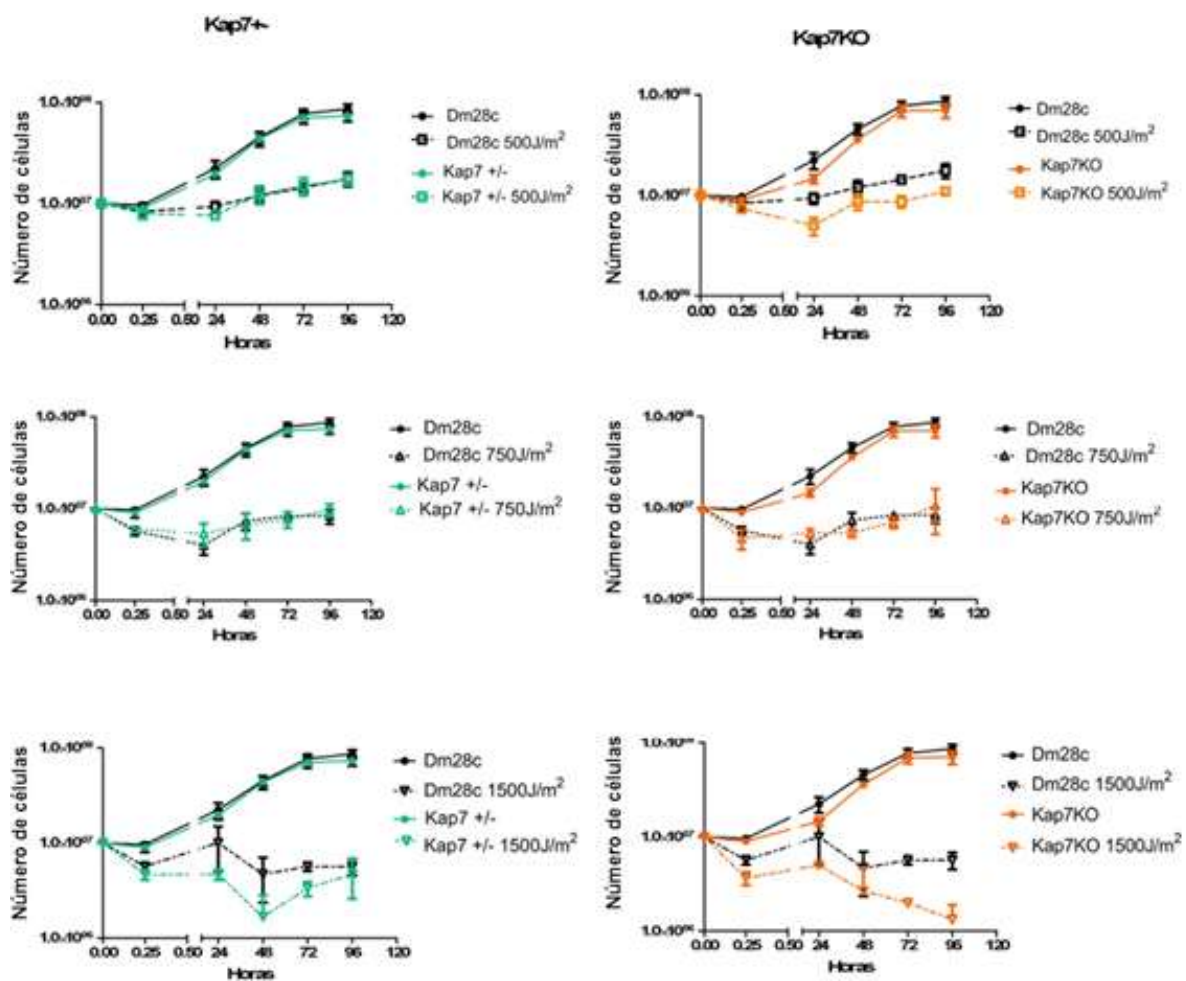


Figura 26 - Curva de crescimento de parasitas heminocutes e duplo nocautes após exposição à diferentes doses de radiação UV – Os gráficos mostram o comportamento de

parasitos heminocautes e nocaute para o gene TcKAP7 após exposição à doses crescentes de radiação UV (500 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 750 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ e 1500 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$). Na coluna à esquerda (em verde) os gráficos correspondendo ao parasito heminocaute; na coluna à direita os gráficos correspondentes ao parasito nocaute.

Como observado no gráfico da maior dose testada (1.500 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) na cepa duplo nocaute para TcKAP7 existe uma morte maior apenas 15 minutos após irradiação. Uma morte tão rápida levanta a hipótese se existem ou não vias de sinalizações envolvidas com esta resposta de morte celular. De fato, nosso grupo já demonstrou que, após tratamento prévio com inibidores inespecíficos das vias de ATM/ATR como a cafeína, ou com inibidor específico para a ATR, o nível de morte observada é diminuído quando em comparação com células irradiadas, porém não inibidas (Mendes, 2016 – dados não publicados).

Dado que o nocaute de TcKAP7 foi capaz de aumentar a sensibilidade a curto e longo prazo da cepa Dm28c à radiação UV, e que esta morte inicial, em células selvagens, é sinalizada de forma que depende da via de ATR, nós investigamos se o mutante para TcKAP7 teria o mesmo comportamento. Para tanto, células mutantes e selvagens foram pré-tratadas com 2mM de cafeína, 10 μM de um inibidor específico para ATM (KU5593 - Catálogo N°.S1092 - Selleckchem) ou 10 μM de um inibidor específico para ATR (Ve821 – Catálogo N°.S8007 - Selleckchem) e depois expostas à 1.500 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV. Como demonstrado na Figura 27, logo após 15 minutos a célula TcKAP7 nocaute tem uma sobrevivência de aproximadamente 38%, enquanto a célula selvagem tem uma porcentagem de sobrevivência de aproximadamente 57%. Em ambas as células, a inibição prévia de ATM não foi capaz de alterar de forma significativa a porcentagem de sobrevivência (que foi de 51% para a célula mutante e 56% para a célula selvagem). Porém, a inibição prévia de ATR fez com que a sobrevivência observada fosse de 78% para a célula mutante e de 85% para a célula selvagem. Como esperado, a inibição com cafeína fez com que a sobrevivência da célula retornasse a quase 100% do esperado para ambas as células.

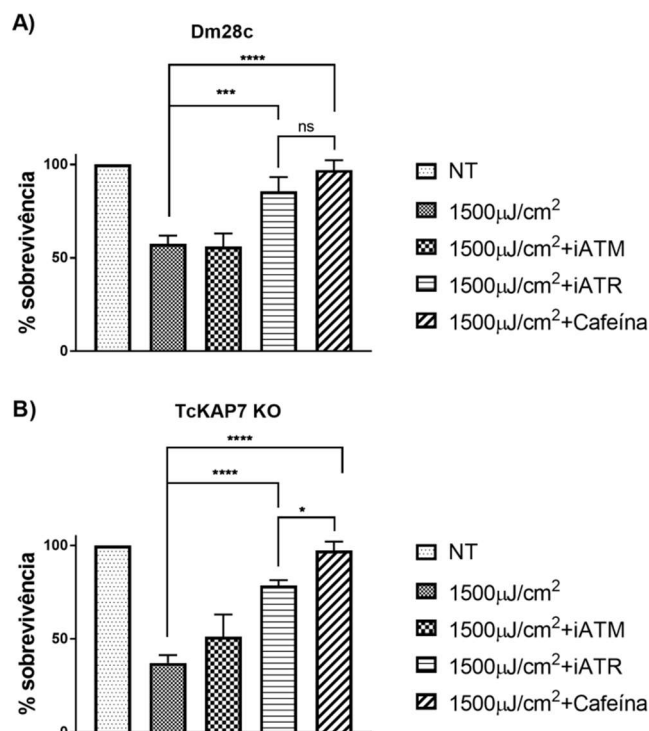


Figura 27 - Exposição à radiação UV após pré-tratamento com inibidores de sinalização –
A) Curva de sobrevivência da cepa controle após pré-tratamento por uma hora com inibidores de ATM, ATR ou cafeína e posterior irradiação com 1500 μJ/cm² de radiação ultravioleta. **B)** Curva de sobrevivência da cepa mutante para TcKAP7 após pré-tratamento com inibidores de ATM, ATR ou cafeína e irradiação com 1500 μJ/cm² de radiação ultravioleta. Como demonstrado na figura a inibição com cafeína ou com inibidor da proteína ATR é capaz de aumentar a sobrevivência após irradiação em ambas as cepas. (**p<0,001; ****p<0,0001, teste t student)

A comparação entre os valores de cada cepa está na Tabela 3. Não existe diferença estatística entre as cepas pré-tratadas com os inibidores, indicando que a quantidade de células que foram resgatadas do processo de morte sinalizada é maior na cepa TcKAP7 que na célula controle selvagem.

Tabela 3 – Valores de sobrevivência das células pré-tratadas ou não com inibidor de ATM, ATR ou cafeína e expostas à radiação ultravioleta.

	1500 μJ/cm ²	1500 μJ/cm ² +iATM	1500 μJ/cm ² +iATR	1500 μJ/cm ² +Cafeína
Dm28c	57,53 ± 4,33	56,06 ± 6,94	85,64 ± 7,55	96,97 ± 5,25
TcKAP7KO	37,12 ± 4,21	51,21 ± 11,86	78,55 ± 2,82	97,22 ± 4,81
p-valor	*	ns	ns	ns

Juntos estes resultados sugerem que Kap7 está envolvida na resposta à radiação UV, dado que a célula é mais sensível em todos os pontos analisados

e que a morte observada é sinalizada, assim como na célula selvagem, pela via de ATR.

4.2.7. Análise de ciclo celular

Já é descrito na literatura que, em diversos organismos, a resposta ao dano ao DNA pode levar a paradas no ciclo celular (HARTWELL; KASTAN, 1994; RASTOGI *et al.*, 2010). Como observamos que a resposta à radiação UV é diferente entre as cepas controle e nocaute, nosso próximo passo foi verificar se existe diferença na parada de ciclo celular entre estas mesmas cepas. Para isso nós utilizamos a análise do conteúdo de DNA utilizando iodeto de propídeo e citometria de fluxo. As células selvagem e mutantes foram expostas à $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV, fixadas como descrito nos materiais e métodos e analisadas a cada 24 horas.

Como mostrado na Figura 28A logo após a irradiação existe um aumento no número de células que foram classificadas como SubG1 na análise, comparando-se as células nocaute irradiadas com as células nocautes não-irradiadas. Esta é uma indicação de que existe morte celular na célula nocaute logo após a irradiação. Este aumento não é visto na análise da célula selvagem irradiada em relação à célula selvagem não irradiada. Os valores das células SubG1 das duas cepas irradiadas começa então a se reduzir após este primeiro momento e nas primeiras 24 horas. A partir de 48 horas percebe-se um novo aumento no número de células SubG1 na célula nocaute para TcKAP7KO, e este aumento continua 72 horas após irradiação. Estes resultados condizem com o observado na curva de irradiação (Figura 28B) no qual é observado um decréscimo no número das células mutantes após 48 horas. Chama atenção também o aumento do número de células nocautes em G1 48 horas após a radiação e a drástica diminuição deste número após 72 horas. Curiosamente, o oposto foi visto com relação às células em fase S, no qual após 48 horas o número de células nocautes é reduzido e volta a aumentar após 72 horas. Estes resultados demonstram que as células nocaute para TcKAP7 são mais sensíveis a altas doses de radiação UV em comparação com a célula selvagem e que as células nocautes apresentam problemas na progressão do ciclo celular em comparação com as células selvagens.

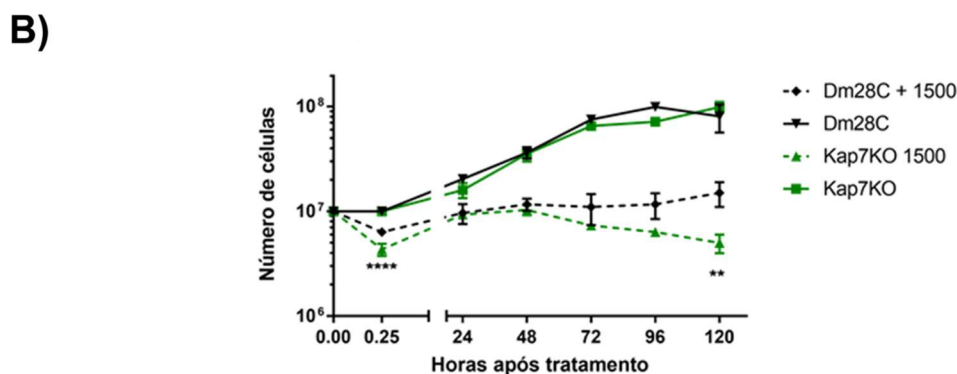
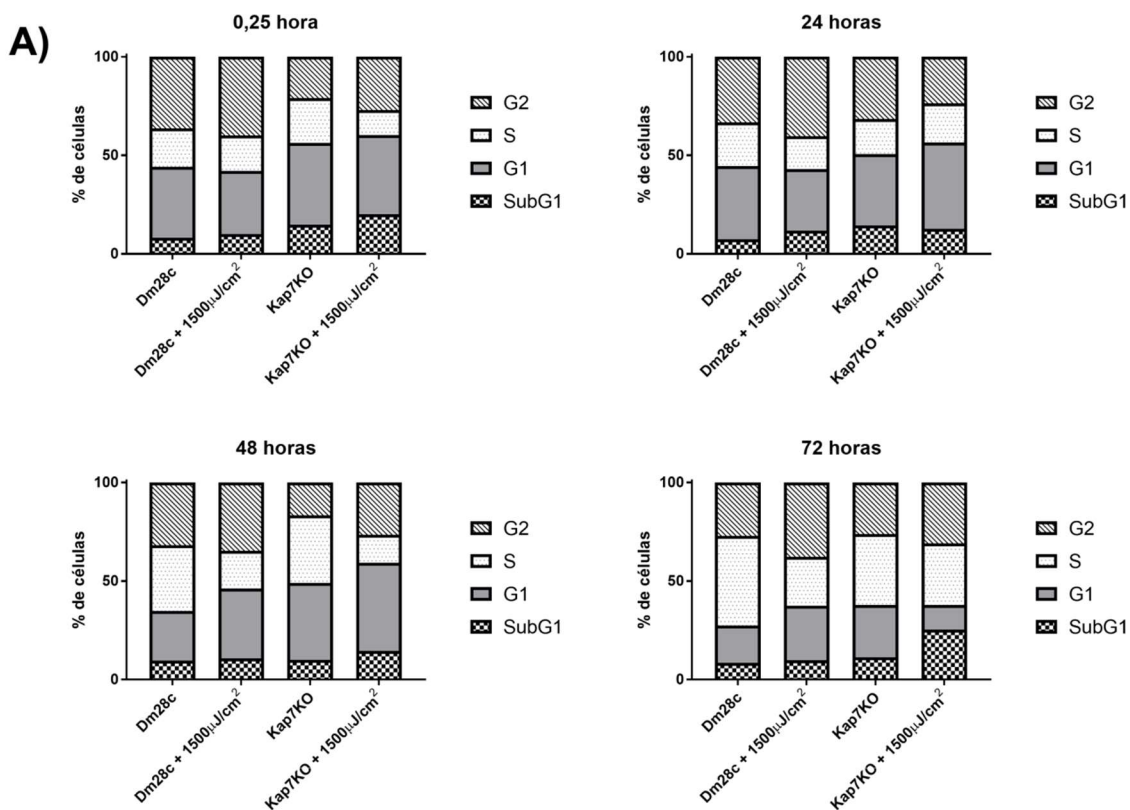


Figura 28 –Análise de ciclo celular após irradiação ultravioleta – A) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular analisadas a partir de ensaio com iodeto de propídeo nos tempos de 15 minutos, 24 horas, 48 horas e 72 horas após irradiação com 1500 μJ/cm². **B)** Curva de irradiação das células utilizadas neste experimento, mostrando a maior sensibilidade da célula após 48 horas e 72 horas de irradiação com radiação UV. (**p<0,01;****p<0,0001, teste t student)

4.2.8. Cinética de reparo após tratamento com cisplatina e radiação UV

Visto que as células mutantes eram mais sensíveis ao tratamento com radiação ultravioleta e cisplatina, nosso próximo passo foi quantificar a quantidade de danos que ambas as células acumulam após exposição à estes

agentes genotóxicos. Para tal, repetimos o mesmo ensaio de qPCR de fragmento longo utilizado no superexpressor de TcMYH anteriormente descrito.

Como mostrado na figura 29, a célula mutante possui um número maior de lesões/10kB que a célula selvagem no primeiro momento após o término do tratamento com cisplatina. Enquanto a célula selvagem tem cerca de 1,4 dano/10kB, a célula mutante tem cerca de 1,98 dano/10kB. Ambas as células apresentaram uma queda no nível de lesão, porém a queda apresentada pela célula mutante foi menos acentuada que a apresentada pela célula selvagem. Importante ressaltar que ambas as células partiram de um nível de dano inicial distinto. Após 5 horas de tratamento também foi visto que os níveis de lesão da célula nocaute são maiores que os níveis de dano encontrado para a célula selvagem, valor este que decai no ponto de 24 horas. Vale ressaltar que, por limitações da técnica, o número de lesões após a primeira hora na célula selvagem é considerado virtualmente indetectável, ao passo que este valor só se torna virtualmente nulo para a célula mutante após 24 horas. Este resultado evidencia então que o nocaute de TcKAP7 foi capaz de atrasar a cinética de reparo de danos causados por cisplatina em *T. cruzi*.

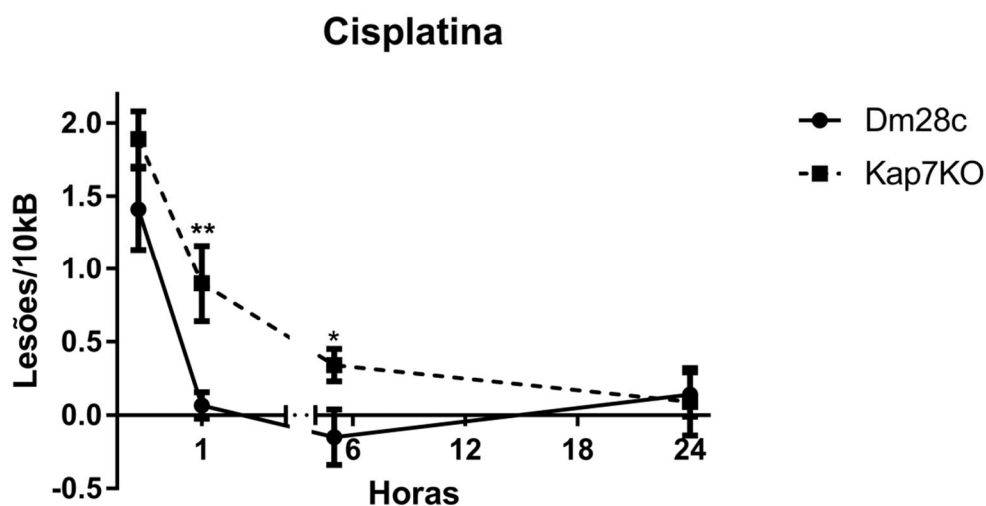


Figura 29- Cinética do reparo de lesões causadas por 300µM de cisplatina - Cinética do reparo de lesões causadas por cisplatina na mitocôndria de células selvagem e células nocaute para TcKAP7. As medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, 5 horas e 24 horas após o tratamento. Ambas linhagens são capazes de reparar seu DNA, ainda que a cinética seja distinta. (*p<0,05; **p<0,01, teste t student)

Como também foi vista uma sensibilidade da célula mutante no tratamento com $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV o mesmo ensaio foi repetido visando quantificar o número de lesões após o tratamento das células selvagens e mutantes. O resultado da figura 29 demonstra que, assim como no tratamento com cisplatina, o nocaute de TcKAP7 também alterou a cinética de reparo. A célula mutante apresentou cerca de 1,81 lesão/10kB no primeiro momento (15 minutos após irradiação), enquanto a célula selvagem apresentou 1,74 lesão/10kB. A cinética de queda apresentada pela célula selvagem, porém, é distinta da apresentada pela célula mutante. Cinco horas após o tratamento a célula mutante apresenta níveis significativamente maiores de lesões que a célula selvagem. Este resultado também demonstra que TcKAP7 está envolvida com a resposta a danos causados por radiação UV.

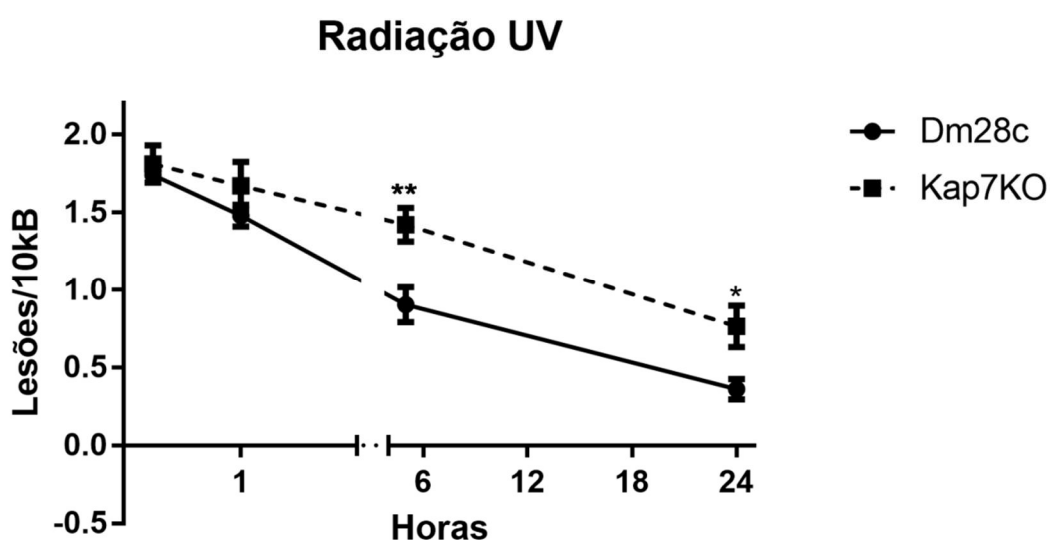


Figura 30 - Cinética do reparo de lesões causadas por $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV - Cinética do reparo de lesões causadas por radiação UV na mitocôndria de células selvagem e células nocaute para TcKAP7. As medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, 5 horas e 24 horas após o tratamento. Assim como observado para o tratamento com cisplatina, ambas as linhagens são capazes de reparar seu DNA, ainda que com cinéticas distintas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, teste t student).

Importante ressaltar que os tratamentos, por mais cuidadoso que sejam, não são capazes de afetar todas as células e que o ciclo de *T. cruzi* é de aproximadamente 24 horas. Dessa forma, como a extração é feita da população total e o experimento é feito com o pool de DNA's desta população, a

medição de lesões acima deste tempo poderia inculir um falso reparo, já que as células que não foram afetadas pelo tratamento continuariam sua replicação e assim teríamos um efeito de diluição do número de danos por célula na população.

4.2.9. Expressão de TcKAP7 após tratamento com cisplatina e radiação UV

Para investigar se os níveis de TcKAP7 são alterados devido aos tratamentos com cisplatina e radiação UV foi feita uma análise de *western blot*. Utilizando o protocolo explicado nos materiais e métodos, extratos totais de proteína foram extraídos de células selvagem logo após, 1 hora, 4 horas e 24 horas depois da exposição ao respectivo agente genotóxico. As proteínas foram então quantificadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a corrida os extratos foram transferidos em membrana de PVDF e os níveis de TcKAP7 foram detectados como descrito nos materiais e métodos. Todos os resultados foram calculados de forma relativa ao controle não-tratado com nenhum dos agentes genotóxicos.

Como demonstrado na Figura 31A, para o tratamento com cisplatina existe um aumento na expressão da proteína 30 minutos após o fim do tratamento. Este aumento continua até atingir um pico de expressão 1 hora após o término do tratamento e depois segue com uma queda significativa nos níveis de expressão após 4 horas. Com 24 horas os níveis voltam a subir, mas continuam menores que os observados nos primeiros tempos analisados.

A cinética de expressão observada para o tratamento com radiação ultravioleta é distinta, como demonstrado na Figura 31B. Ao contrário da cinética observada para cisplatina, a expressão de TcKAP7 após exposição à radiação ultravioleta é crescente até atingir o pico de expressão 24 horas após o tratamento. Em comparação, os níveis da proteína só são maiores que os observados no controle não-irradiado após 4 horas, ainda que o aumento seja observado seja pequeno.

Juntos estes resultados demonstram que TcKAP7 altera sua expressão em resposta ao tratamento com agentes genotóxicos como cisplatina e a

radiação ultravioleta. Isto é uma indicação que a proteína pode estar envolvida no metabolismo de danos ao DNA mitocondrial de *T. cruzi*.

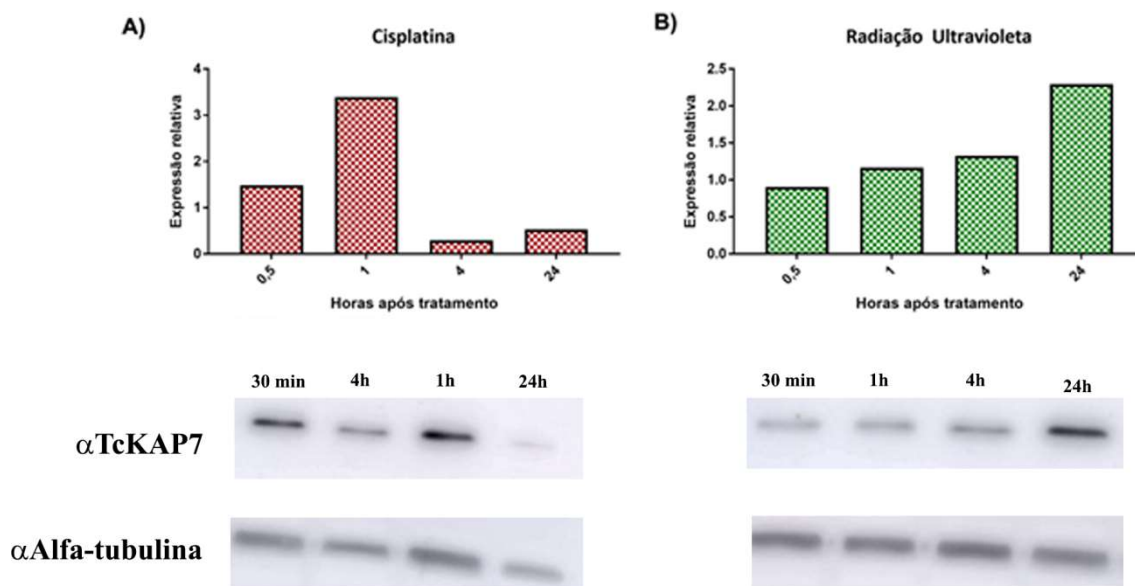


Figura 31 - Western blot de TcKAP7 em células selvagem após tratamento com agentes genotóxicos – A) Western blot de células selvagem após tratamento com 300 μ M de cisplatina por uma hora. Como demonstrado no gráfico existe um pico de expressão 1 hora após o tratamento com cisplatina e uma acentuada redução nos níveis de TcKAP7 após este tempo. **B)** Western blot de células selvagem após exposição à 1500 μ J/cm² de radiação ultravioleta. O gráfico demonstra que o aumento nos níveis de TcKAP7 é mais demorado no tratamento com radiação ultravioleta, tendo o maior nível 24 horas após o tratamento. Abaixo de cada gráfico estão as bandas utilizadas para quantificação e os respectivos controles endógenos de cada amostra. A imagem original das bandas de western blot está presente no anexo 1.

4.2.10. Via de morte após tratamento com cisplatina e radiação UV

Nossos dados demonstram que TcKAP7 tem sua expressão alterada em resposta ao tratamento com cisplatina e radiação UV e que o nocaute desta proteína aumenta a sensibilidade do parasito a estes mesmos agentes genotóxicos. Esta sensibilidade foi observada tanto nos primeiros momentos após o tratamento genotóxico quanto em tempos longos após 24 horas. Já foi descrito na literatura que o tratamento com radiação ultravioleta é capaz de induzir, entre outras respostas, a morte celular causada por apoptose em células de mamífero (LEE *et al.*, 2013), embora o mecanismo pelo qual esta via ocorre ainda necessita ser completamente elucidado. Também já foi descrito que o tratamento com cisplatina também é capaz de levar a morte celular por apoptose

(TANIDA *et al.*, 2012). Nosso próximo passo então foi investigar se a morte observada tanto na célula selvagem quanto na célula nocaute foram causadas por apoptose induzida pelos tratamentos genotóxicos. Para isso foi feito um ensaio de anexina V e iodeto de propídeo.

Neste ensaio é medido tanto a exposição de fosfatidilserina na membrana externa da célula – um sinal do início do processo de apoptose (KOOPTMAN *et al.*, 1994) – quanto a ligação de iodeto de propídeo em ácidos nucleicos da célula (CROWLEY *et al.*, 2016). Esta análise permite inferir a porcentagem de células que estão em processo de apoptose inicial (marcadas apenas com anexina V), apoptose tardia (marcadas com iodeto de propídeo e anexina V) e uma indicação de um processo de necrose (marcadas apenas com iodeto de propídeo).

Como observado no gráfico do painel superior da Figura 32, após uma hora do tratamento com $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV foi visto que, na célula selvagem, ocorre a exposição de fosfatidilserina. Após 48 horas o padrão de marcação observado se alterou e foi visto que a morte observada apresenta padrões de apoptose inicial e apoptose tardia, com marcação de anexina V e penetração de iodeto de propídeo na célula. Após 96 horas foi observado que os níveis das três marcações diminuem a níveis semelhantes aos observados nas células não tratadas.

Para o duplo nocaute de TcKAP7 (painel inferior da Figura 32) houve uma mudança drástica no tipo de marcação encontrado. Logo após uma hora ocorre um alto nível de marcação apenas de iodeto de propídeo, um indicador de uma possível via de necrose. Este padrão de marcação continuou até o ponto de 48 horas (ponto este que, na curva de crescimento, começa a se observar o fenótipo de morte tardia, como mostrado na figura 28B) e todas as marcações foram reduzidas em 96 horas a níveis semelhantes aos das células não tratada. Estes resultados demonstram que o nocaute de TcKAP7 foi capaz de alterar o tipo de morte celular apresentada pelas células após exposição à radiação UV.

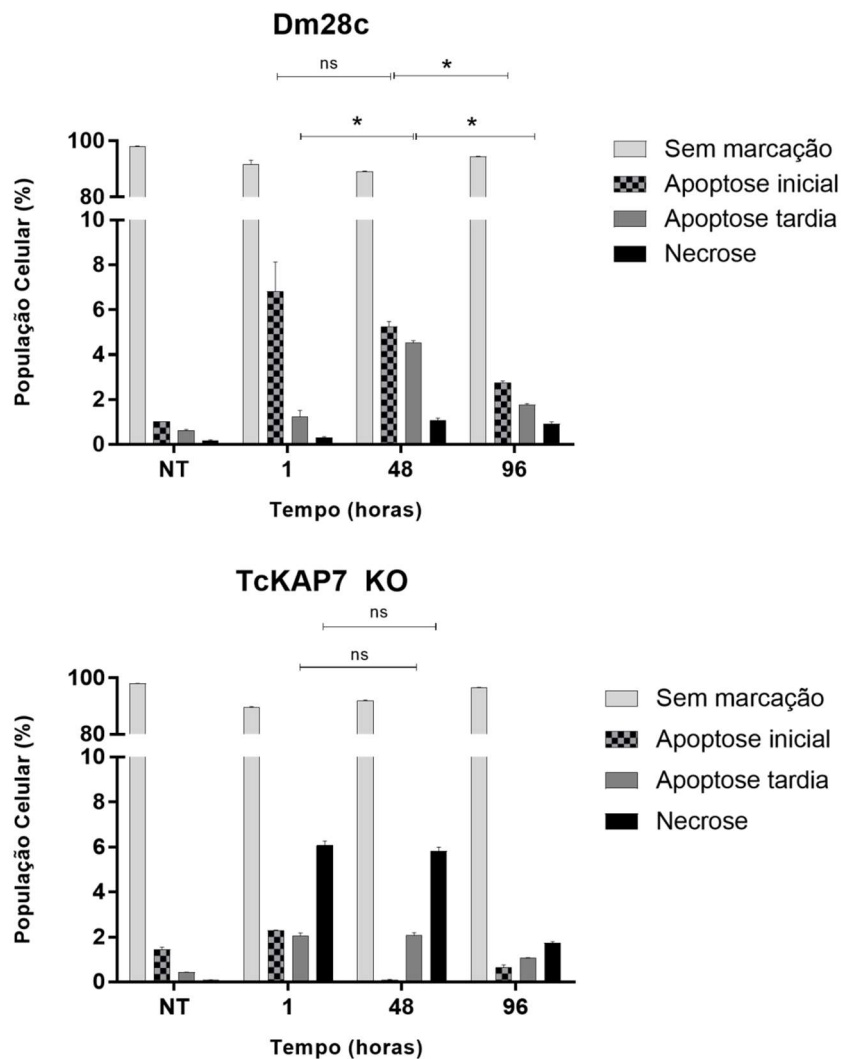


Figura 32 - Ensaio de anexina V e iodeto de propídeo após exposição à radiação UV – O gráfico demonstra a porcentagem de células marcadas para apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose após ensaio em citometria de fluxo. Como demonstrado, ao passo que a célula Dm28c apresenta marcação para apoptose inicial nos tempos de 1 hora e 48 horas após exposição à radiação ultravioleta, o nocaute de TcKAP7 apresenta uma porcentagem maior de células marcadas para necrose nestes mesmos tempos. A curva de crescimento utilizada neste ensaio está no anexo 2 (* $p < 0,05$, One-way ANOVA)

Nosso próximo passo foi investigar se o mesmo fenótipo de alteração no tipo de morte ocorria também na célula nocaute para TcKAP7 após o tratamento com cisplatina. Como demonstrado na Figura 33 existe uma diferença na morte observada entre a célula selvagem e mutante. Enquanto os níveis de apoptose inicial encontrados logo após o tratamento para Dm28c são de cerca de 6%, na célula nocaute para TcKAP7 este valor é mais de 2 vezes maior, chegando à

12,7%. Também se encontra uma pequena marcação para necrose na célula selvagem, cerca de 2,7%, ao passo que o mutante apresenta menos de 1% de células marcadas para necrose. Surpreendentemente este alto nível de apoptose inicial observada na célula mutante não se reflete em números igualmente altos nos outros tempos analisados. Este resultado demonstra que a falta de TcKAP7 pode estar tornando as células mais sensíveis ao tratamento com cisplatina. Também podemos inferir que os tipos de morte causados por cada um dos agentes genotóxicos é distinto no mutante de TcKAP7.

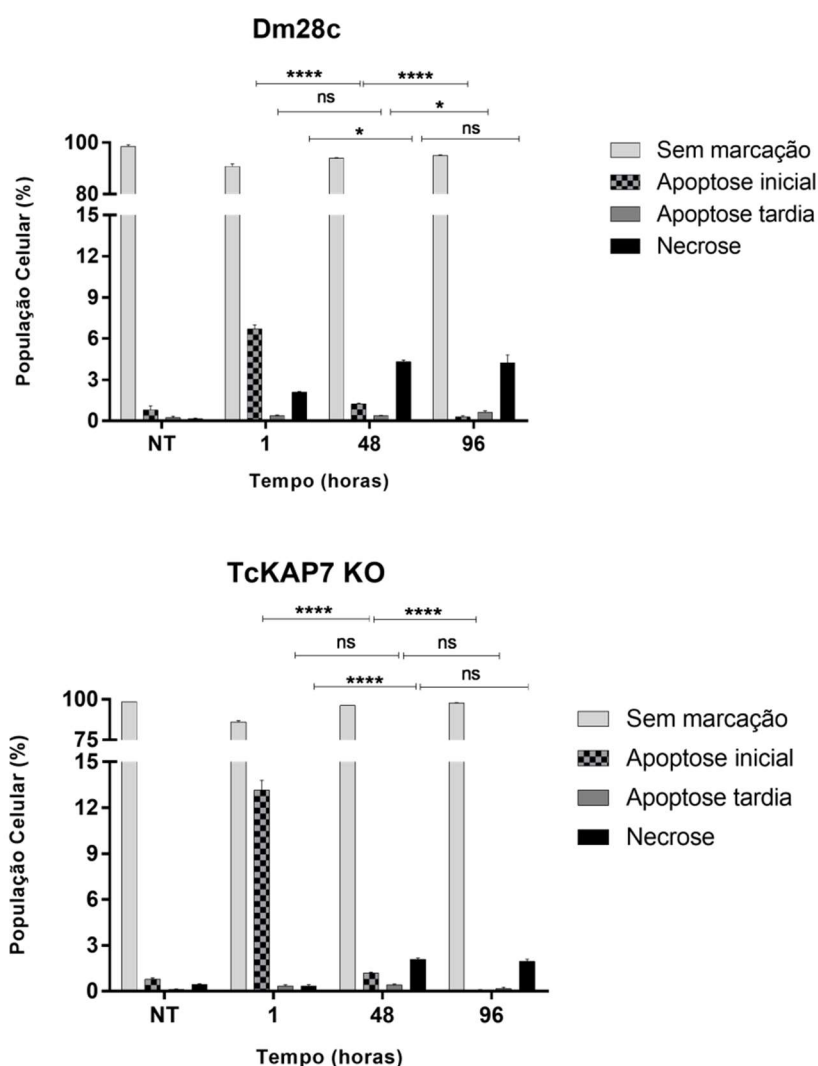


Figura 33 - Ensaio de anexina V e iodeto de propídeo após exposição à cisplatina – O gráfico demonstra a porcentagem de células marcadas para apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose após ensaio em citometria de fluxo. Como demonstrado, o nível de marcação para apoptose inicial é mais alto na célula TcKAP7 nocaute. A curva de crescimento utilizada neste ensaio está no anexo 2 (*p<0,05; **p<0,01;***p<0,001,****p<0,0001, One-way ANOVA)

4.3. AdKAP7

4.3.1. Tratamento com cisplatina

Durante o desenvolvimento do projeto de investigação das vias de reparo mitocondrial em *T. cruzi* surgiu a oportunidade de realizar experimentos com outro membro da ordem Kinetoplastida, o parasito *Angomonas deanei*. Nos foi cedido pelo laboratório da professora Dra. Maria Cristina Motta uma cepa mutante para o gene AdKAP7, um possível homólogo de TcKAP7.

Nosso primeiro passo foi ver a resposta dos mutantes de AdKAP7 contra os tratamentos de cisplatina, radiação UV. Os estudos foram iniciados com a caracterização da resposta ao tratamento com cisplatina. Como demonstrado na Figura 34A, a célula heminocautada para AdKAP7 não apresenta diferença significativa na sensibilidade à cisplatina logo após o tratamento. Porém, quando é calculada a sobrevivência relativa destas células após 12 horas (2 ciclos do parasito, que é de aproximadamente 6 horas), nota-se que a célula mutante apresenta uma sensibilidade maior que a célula selvagem. Este fenótipo fica ainda mais claro quando se analisa a sobrevivência após 24 horas.

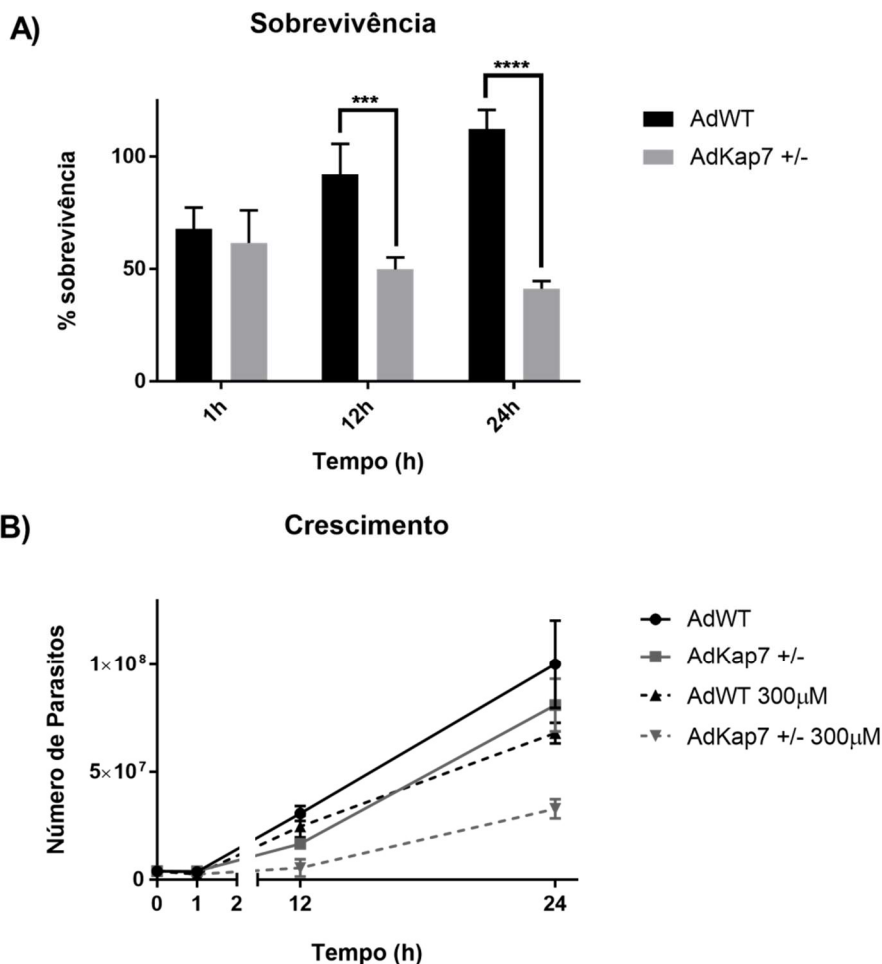


Figura 34 - Resposta de AdKAP7 +/- ao tratamento com cisplatina – A) Curva de sobrevivência de cepas selvagem e mutantes para AdKAP7 nos tempos de 1 hora, 12 horas e 24 horas após tratamento com cisplatina. A sensibilidade da célula mutante é evidente apenas após dois ciclos de replicação (12h e 24h). **B)** Curva de crescimento após exposição à cisplatina. Como demonstrado, a célula mutante ainda é capaz de crescer, mas de forma prejudicada quando comparada com a célula selvagem. (**p<0,001, ***p<0,0001)

Como o cálculo de sobrevivência é feito de forma relativa às células não tratadas com cisplatina naquele mesmo tempo, a queda na sobrevivência observada pode vir a partir da diferença no crescimento das duas cepas. De fato, quando analisamos a curva de crescimento (Figura 34 B), observamos que não existe uma morte exacerbada na célula mutante, mas sim um atraso no crescimento das mesmas. A célula mutante ainda é capaz de crescer, embora este crescimento seja prejudicado. Estes resultados demonstram então que

AdKAP7 está também envolvida com a resposta aos danos causados por altas doses de cisplatina.

4.3.2. Formas aberrantes após tratamento com cisplatina

Como nós observamos que a célula mutante para AdKAP7 apresentava um possível problema de replicação (devido ao seu crescimento prejudicado e a observação visual em microscópio ótico), nosso próximo passo foi observar se estes problemas de replicação geravam formas celulares aberrantes.

Uma característica interessante de *Angomonas deanei*, como já dito anteriormente, é a presença de um simbiote com DNA próprio que se replica de forma coordenada com seu hospedeiro (MOTTA, MARIA CRISTINA MACHADO *et al.*, 2010). Frente à problemas de metabolismo de DNA este simbiote se filamenta (CATTAPRETA *et al.*, 2015), se tornando uma forma útil de se rastrear problemas de replicação no parasito. Utilizando-se deste fato, nós tratamos as células selvagem e as células mutantes com 300µM de cisplatina e foi feita uma marcação com DAPI para evidenciar a presença de simbioses filamentosos.

Como mostrado na Figura 35A, a deleção de uma das cópias de AdKAP7 já é capaz de causar problemas na replicação do simbiote. Em comparação com a célula selvagem, este mutante possui 36,6% de células com problemas de filamentação do simbiote. Na célula selvagem, o número de células filamentosas é aumentado para cerca de 14% quando ocorre o tratamento com 150µM de cisplatina. Surpreendentemente, o número de células com problemas na filamentação do simbiote decresceu com o aumento da dose de cisplatina de 300µM, ficando ao redor de 3%. Na análise do mutante de AdKAP7 foi visto que em ambos os tratamentos o número de células filamentosas diminui após exposição à cisplatina. Enquanto, sem o tratamento a porcentagem de células filamentosas era de 36,6%, com o tratamento com 150 µM este número caiu para 1%; com o tratamento com 300 µM este número chegou a 3%, assim como na célula selvagem. A figura 35B demonstra a forma atípica de um simbiote filamentoso e que foi considerada neste trabalho. Estes resultados demonstram

que o tratamento com cisplatina é capaz de causar problemas de replicação no parasito.

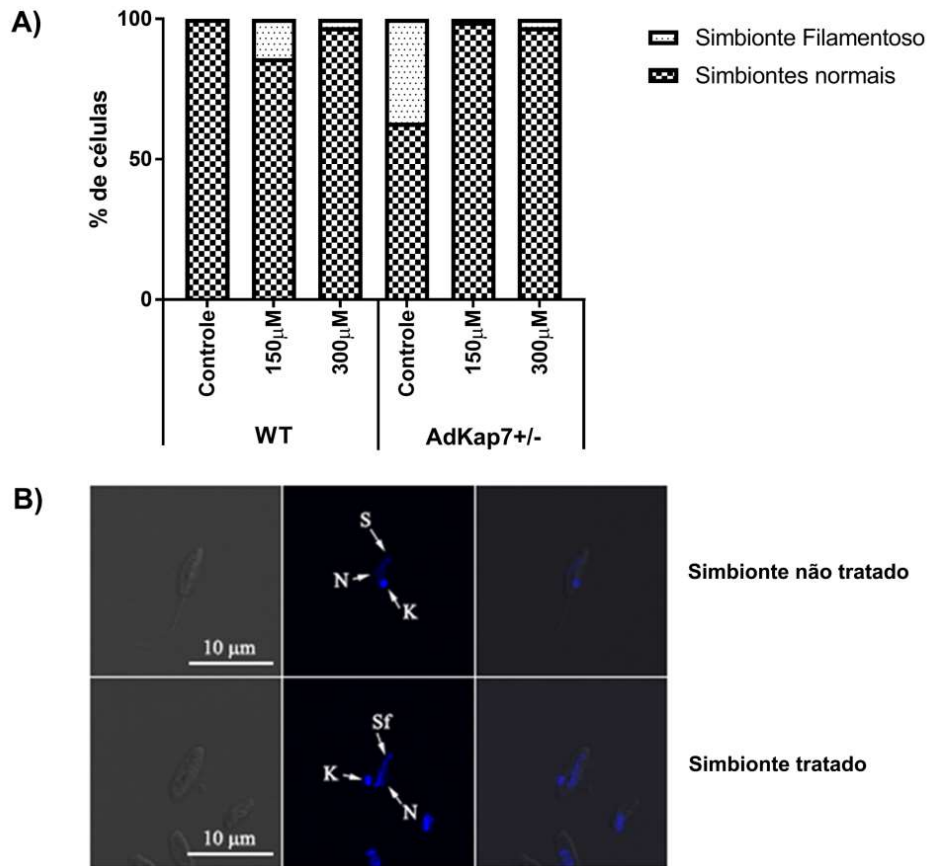


Figura 35 - Porcentagem de células com simbiote filamentado – A) Porcentagem de células, da cepa selvagem e mutante para AdKAP7, que apresentaram fenótipo de simbiote filamentado antes e após tratamento com cisplatina. A célula mutante já apresenta níveis maiores de filamentos mesmo antes do tratamento com cisplatina. **B)** Imagem representativa da diferença no padrão de DNA entre células tratadas e não-tratadas com cisplatina. O tratamento causa um padrão de filamentos no simbiote facilmente identificável após coloração com DAPI, como demonstrado na figura.

4.3.3. Tratamento com radiação ultravioleta

Nosso próximo passo foi verificar se a sensibilidade vista para o nocaute de TcKAP7 em *T. cruzi* em tratamento com radiação ultravioleta também era observada no heminocaute de AdKAP7. Para isso, os mutantes de AdKAP7 e as células selvagem foram irradiadas com a mesma dose utilizada no tratamento das cepas de *T. cruzi*.

Como demonstrado na Figura 36A, assim como a célula mutante em *T. cruzi*, o mutante de AdKAP7 também é mais sensível à radiação ultravioleta no primeiro momento. A sobrevivência da célula selvagem irradiada em comparação com a célula não irradiada foi de 62,97%, ao passo que a célula mutante teve uma sobrevivência de apenas 35,82%, uma diferença significativa entre as duas cepas. O tratamento com cafeína uma hora antes da exposição à radiação UV foi capaz de restaurar a taxa de sobrevivência da célula selvagem para 88,24% e da célula mutante para 68,62%. O tratamento com cafeína 30 minutos após a irradiação não foi capaz de alterar os níveis de sobrevivência de forma significativa de nenhuma das duas cepas (os valores e a comparação entre cada cepa estão na Tabela 4). O crescimento das cepas não teve comportamento alterado (Figura 36B). Apesar do platô mais baixo, ao contrário da célula nocaute para TcKAP7, não existe uma morte tardia pronunciada. Estes resultados mostram que os danos causados por UV geram uma sinalização e que AdKAP7 está envolvida com a resposta à radiação UV.

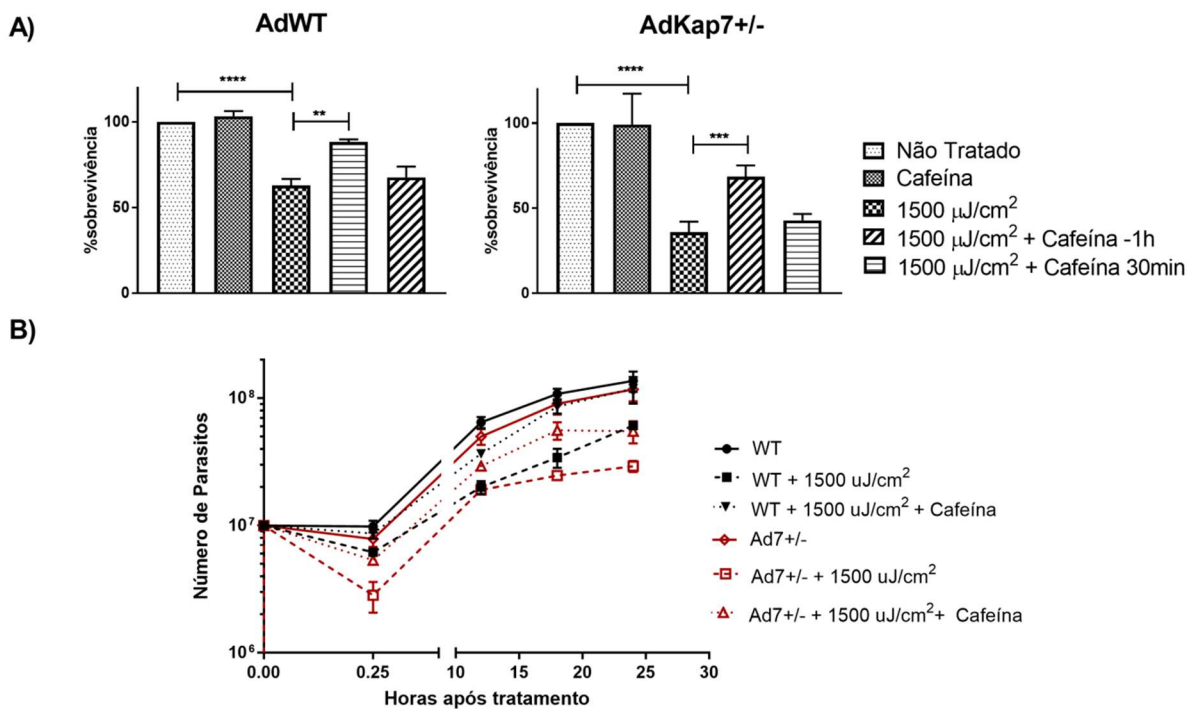


Figura 36 - Resposta à radiação ultravioleta – A) Curvas de sobrevivência das células controle (AdWT, à esquerda) e mutante (AdKAP7 +/-, à direita) 15 minutos após a exposição à radiação UV. As células também foram inibidas 1 hora antes com cafeína e 30 minutos após a irradiação, quando foram contadas. Como demonstrado, apenas a inibição com cafeína

antes da irradiação é capaz de restaurar a sobrevivência de ambas as cepas. **B)** Curva de crescimento das células após exposição à radiação UV, com e sem pré-tratamento com cafeína. A cepa mutante é mais sensível à radiação UV porém é capaz de retomar o crescimento, ainda que de forma prejudicada em comparação com a célula selvagem. (**p<0,01;***p<0,001,****p<0,0001, teste t student)

Tabela 4 - Porcentagem de sobrevivência após irradiação com radiação UV em células pré-tratadas com cafeína ou tratadas após irradiação UV

	1500µJ/cm ²	1500µJ/cm ² +Cafeína (1 hora antes)	1500µJ/cm ² +Cafeína (30 minutos após)
AdWT	62,97 ± 3,79	88,24 ± 1,65	67,66 ± 6,31
AdKAP7+/-	35,82 ± 6,30	68,62 ± 6,57	42,80 ± 3,89
p-valor	***	**	**

4.3.4. Cinética de reparo após tratamento com cisplatina e radiação UV

Visto que as células mutantes, assim como as de *T. cruzi*, eram mais sensíveis ao tratamento com radiação ultravioleta, nosso próximo passo foi quantificar a quantidade de danos que ambas as células acumulam após tratamento com radiação UV e cisplatina. Para tanto repetimos o mesmo ensaio de qPCR de fragmento longo utilizado anteriormente.

Como mostrado na figura 37, a célula mutante possui um número maior de lesões/10kB que a célula selvagem no primeiro momento após tratamento com cisplatina, ainda que não significativo. Enquanto a célula selvagem tem cerca de 1,46 dano/10kB, a célula mutante tem cerca de 1,62 dano/10kB. Ambas as células apresentaram uma queda acentuada no nível de lesão na primeira hora. Após 3 horas de tratamento também foi visto que os níveis de lesão da célula nocaute não são maiores que os níveis de dano encontrado para a célula selvagem, valor este que decai no ponto de 6 horas.

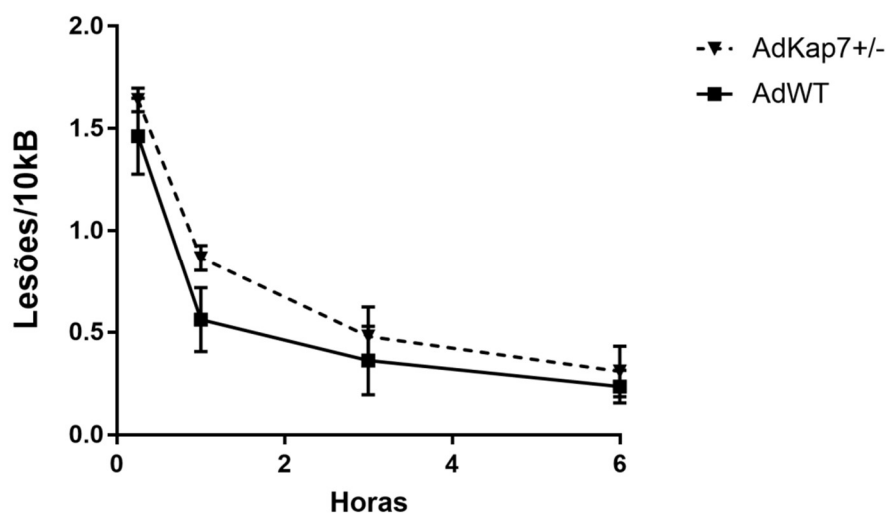


Figura 37 - Cinética do reparo de lesões causadas por 300 μ M de cisplatina - Cinética do reparo de lesões causadas por cisplatina na mitocôndria de células selvagem e células heminocautas para AdKAP7. As medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, 3 horas e 6 horas após o tratamento. Não existe diferença observável entre a cepa selvagem e mutante

Ao contrário do observado em *T. cruzi* após tratamento com radiação UV, a alteração dos níveis de AdKAP7 não alterou a cinética de reparo de forma significativa. Os níveis de danos são semelhantes entre as células mutantes e selvagens em todos os pontos analisados. A célula mutante apresentou cerca de 1,85 lesão/10kB no primeiro momento (15 minutos após irradiação), enquanto a célula selvagem apresentou 1,94 lesão/10kB. A cinética de queda apresentada pela célula selvagem (inclinação entre o ponto inicial e o ponto de 1 hora), porém, foi bem semelhante durante todo o percurso da cinética de reparo, sugerindo que uma cópia deste gene talvez seja suficiente para lidar com este dano.

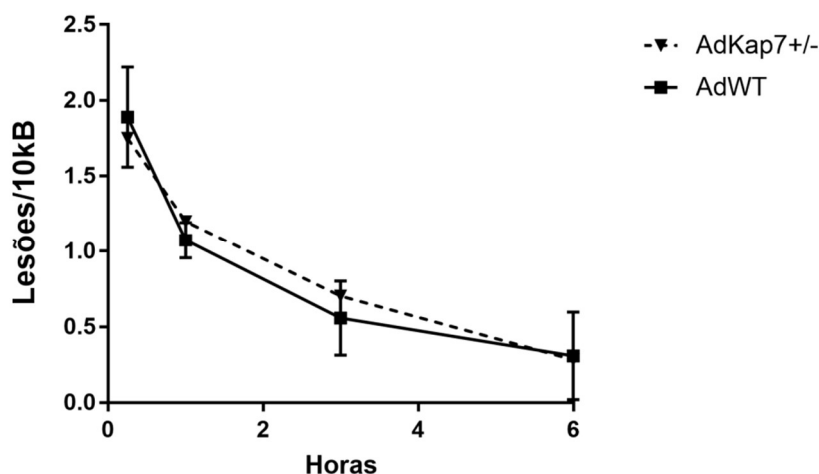


Figura 38 - Cinética do reparo de lesões causadas por 1500 μ J/cm² de radiação UV - Cinética do reparo de lesões causadas por radiação UV na mitocôndria de células selvagem e células heminocautas para AdKAP7. As medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, e horas e 6 horas após o tratamento. Assim como observado anteriormente no tratamento com cisplatina, não foi observada diferença entre os níveis de lesão e a cinética de reparo das cepas mutante e selvagem.

Estes resultados sugerem que AdKAP7 está envolvida com a resposta aos danos de DNA gerados pelos agentes genotóxicos, mas não atua de forma direta na resolução destes danos.

4.3.5. Alterações de morfologia celular após tratamento com cisplatina e radiação UV

Como dito anteriormente, um dos fenótipos observados durante a contagem das curvas por microscopia ótica foi a alteração morfológica dos organismos após tratamento com cisplatina. Afim de investigarmos mais detalhadamente a morfologia destas células, foi feita microscopia eletrônica de varredura após tratamento com 150 μ M e 300 μ M de cisplatina e 1500 μ J/cm² de radiação UV.

Primeiramente foi feita a investigação se o nocaute da proteína já seria capaz de alterar a morfologia e organização da ultraestrutura do kDNA. A Figura 39 demonstra que, ao contrário do nocaute completo de *T. cruzi*, no qual foi mostrado que a ultraestrutura do disco do kDNA do parasito não foi alterada (MORINI, 2015), a ultraestrutura do arranjo do kDNA de *A. deanei* sofreu

alterações pela deleção de uma das cópias do gene AdKAP7. Em comparação com a célula controle (Imagens A, B e C da Figura 39), o mutante para este gene, possui uma organização distinta (imagens D, E e F da figura 39). Os discos de kDNA no mutante apresentam DNA's mais compactados (em níveis diferentes entre eles), demonstrando que AdKAP7 pode estar envolvida com a organização do kDNA neste organismo.

Como dito anteriormente, um dos fenótipos observados durante a contagem das curvas por microscopia ótica foi a alteração morfológica dos organismos após tratamento com cisplatina e radiação ultravioleta. Para investigarmos mais detalhadamente a morfologia destas células, foi feita microscopia eletrônica de varredura após tratamento com 150 μM e 300 μM de cisplatina e 1500 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV.

Quando foi feita a análise de células selvagem após tratamento com cisplatina, foi visto que o tratamento com 150 μM (Figuras 40 B e C do painel superior) faz com que surjam células de formato globular. Também foi visto que, após o tratamento, surgem células com dois corpos celulares, mas que não completaram a divisão celular (Figura 40C do painel superior). No tratamento com 150 μM de cisplatina percebe-se que existem células com formato bem arredondando e flagelos mais curtos. A mesma análise com as células AdKAP7 (Figura 40 C do painel inferior) demonstrou que algumas células naturalmente já possuem problemas como a presença de flagelos curto (seta verde) ou até mesmo sem flagelo (seta laranja). Quando as células foram tratadas com 150 μM , foi possível observar células com formato aberrante e mais de um flagelo (seta rosa) e células que apresentaram protuberâncias e projeções do citoplasma (seta amarela). Com 300 μM também foi possível observar estas células modificadas, com formatos aberrantes e protuberâncias.

Após a análise das células tratadas com cisplatina, foi feita a análise de células irradiadas com radiação UV. Na contagem das curvas de crescimento e sobrevivência foi observado que, após a irradiação e com o passar dos ciclos, ocorre uma diminuição no ritmo de crescimento das células e o surgimento evidente de formas celulares aberrantes. Nosso próximo passo foi então verificar se, com o passar do tempo, o dano causado no DNA de *A. deanei* era capaz de

causar modificações na morfologia celular utilizando o protocolo de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Células selvagem e mutantes para o gene AdKAP7 foram então novamente irradiadas e fixadas como explicado nos materiais e métodos.

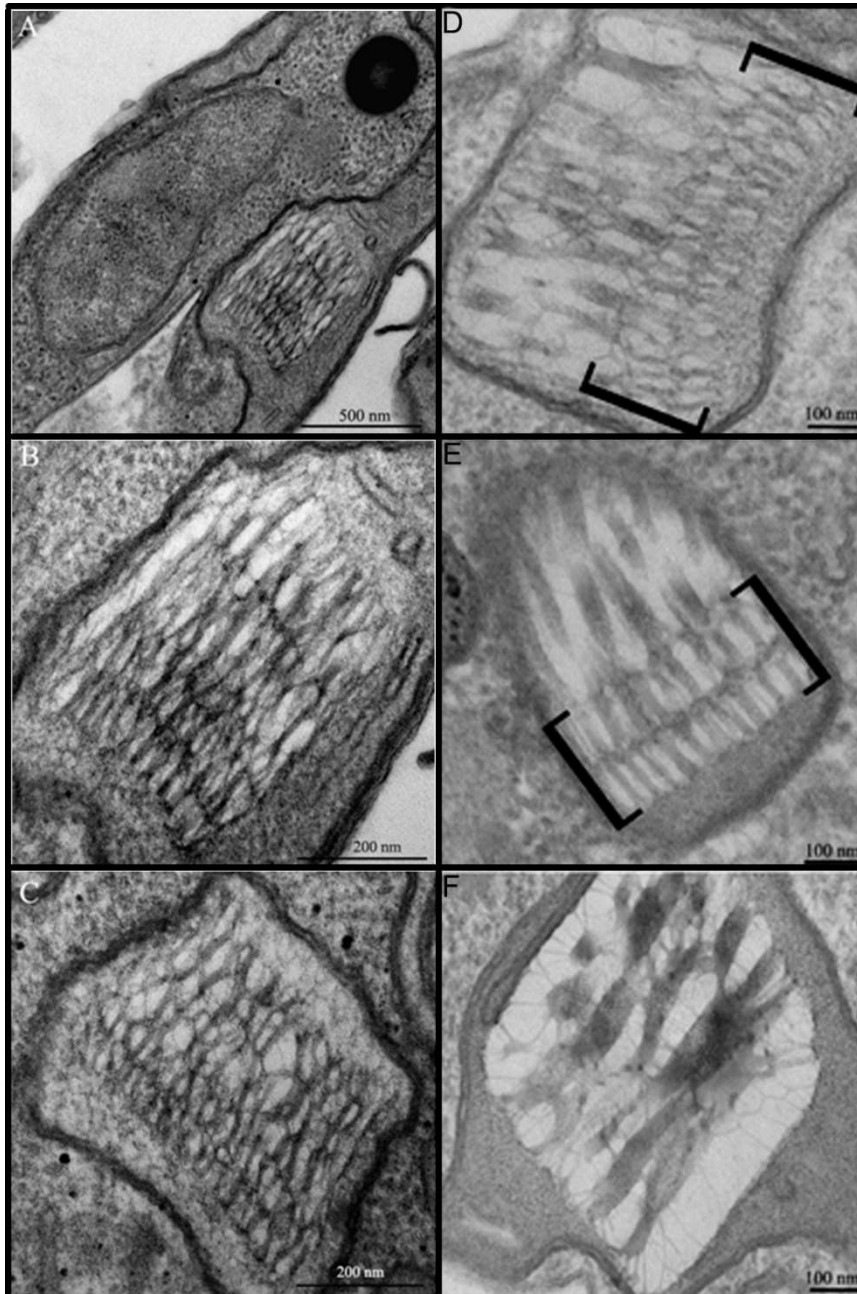


Figura 39 - Ultraestrutura do kDNA de células selvagem e mutantes para AdKpa7 – Ultra estrutura do kDNA de células selvagem de *A. deanei*, demonstrando diferentes células com níveis de compactação semelhante (**A, B e C**). Na direita células mutantes para AdKAP7, demonstrando que a compactação é diferente da encontrada na célula selvagem (**D, E e F**). As imagens mostram três níveis distintos de compactação, sendo que o DNA da imagem F é o mais desorganizado.

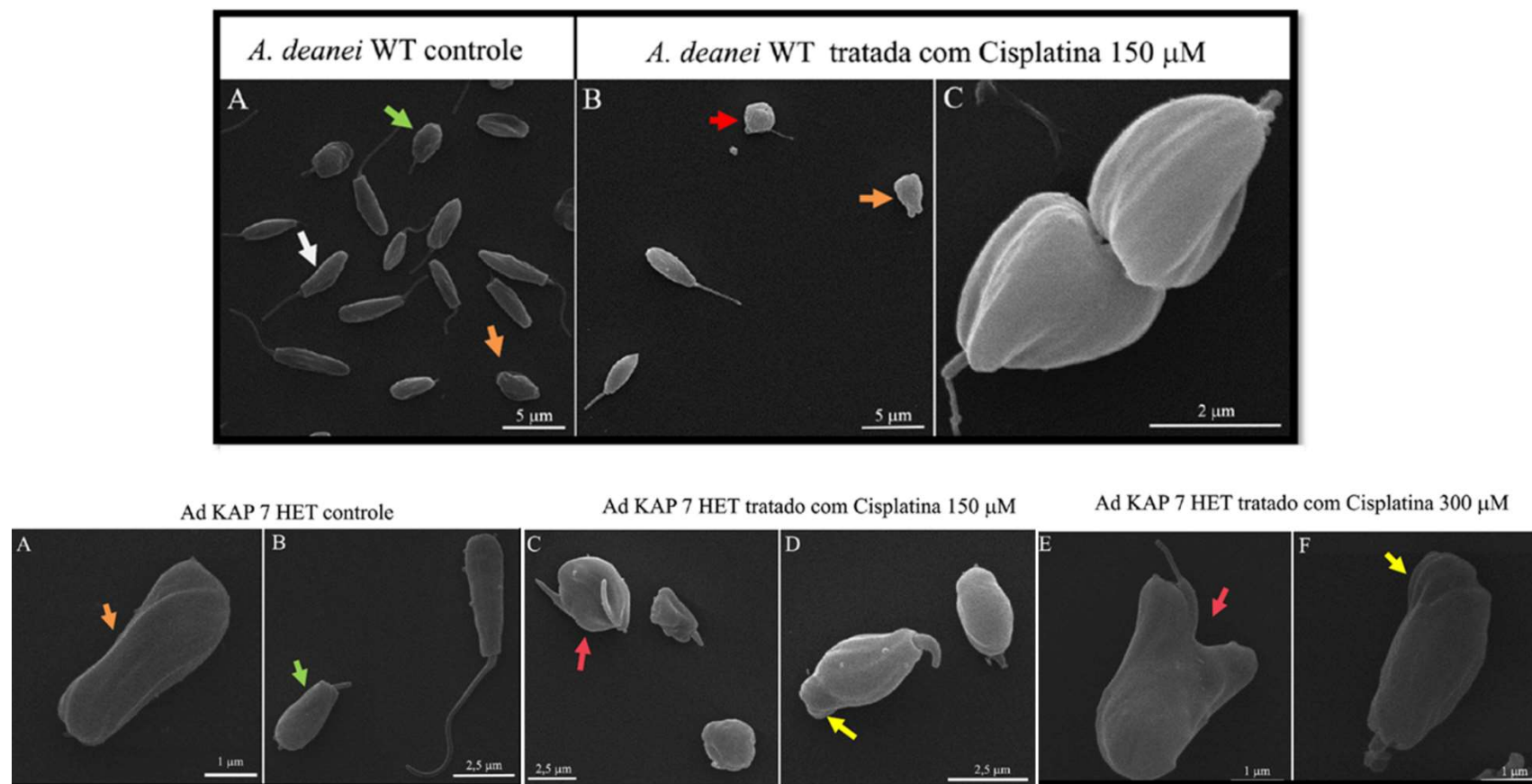


Figura 40 – MEV de Protozoários *Angomonas deanei* selvagem (WT) e mutantes para AdKAP7 após tratamento com cisplatina – Painel superior: Células selvagem não irradiadas (A) e após tratamento com 150 μM de Cisplatina (B e C). Seta branca: células com aspectos normais, seta verde: células com flagelo curto, seta laranja: células sem flagelo, seta vermelha: célula com formato globular. Painel inferior: Células heminocaute para Ad KAP7. Células não trata (A e B) e após 24 horas de tratamento com 150 μM (C e D) e 300 μM (E e F) de cisplatina. Seta verde: células com flagelo curto; seta laranja: células sem flagelo; seta rosa: células aberrantes; seta amarela: células com protuberâncias na região posterior do corpo celular.

Como mostrado na Figura 41, após irradiação com radiação UV a célula selvagem apresenta algumas formas aberrantes, com protuberâncias e projeções que podem indicar prejuízo na replicação celular. A imagem demonstra que existem parasitos com dois flagelos (Figuras 41A e 41B), que possuem alterações morfológicas significativas na membrana celular com projeções de citoplasma (Figura 41C) e que possuem formas arredondadas e de flagelo curto, característica de tratamento genotóxicos em células de outros tripanossomatídeos, como *T. cruzi* e *T. brucei*.

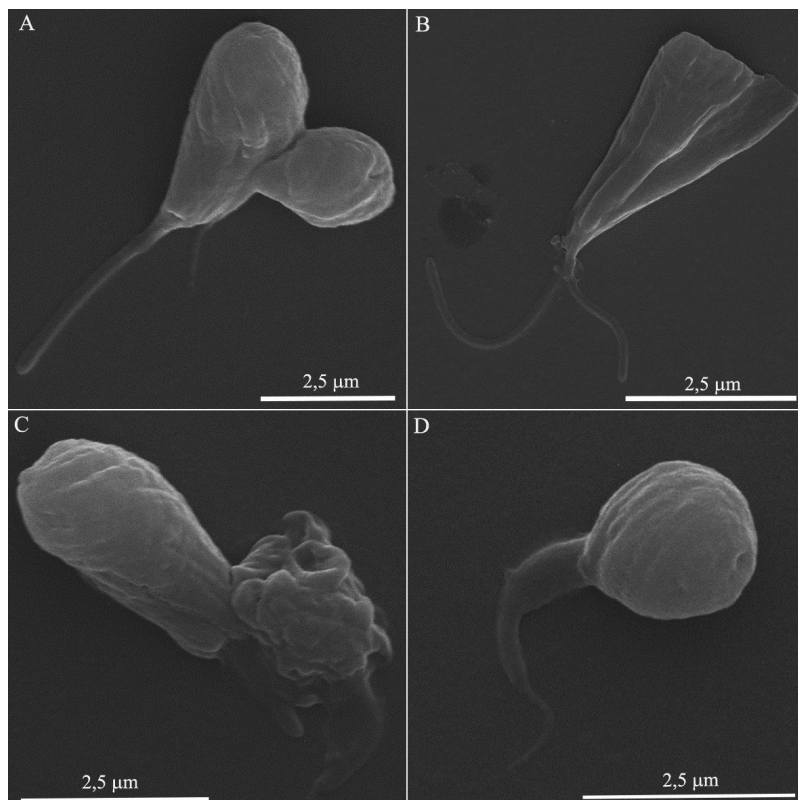


Figura 41 – MEV de células selvagem irradiadas com 1500 μ J/cm² de radiação UV – Microscopia representativa de vários exemplares de fenótipo observados após irradiação com radiação UV. Após 12 horas se observa problemas na divisão celular de diversos indivíduos na população.

A mesma análise foi feita também para as células mutantes para AdKAP7 (Figura 42). Assim como na célula selvagem, após 12 horas da irradiação com radiação UV também foi observado que existem células com morfologia alterada na população. Foi detectado que existem células com pequenas protuberâncias e alterações morfológicas (Figuras 42A e 42B), mas chama a atenção a severidade das

alterações observadas neste mutante. As figuras 42C, D, E e F demonstram alguns parasitas que possuem problemas sérios causados pelo dano ao DNA. Fica claro, na figura 42F, que este fenótipo demonstra um sério problema na replicação do parasito, algo não observado nas células selvagem. Na célula mutante é possível se observar células que aparentam ter problemas na citocinese (Figuras 42B e C) porém no heminocute de AdKAP7 é possível se observar células que aparentam ser dois ou três corpos celulares (Figura 42C, D e E) ou até mesmo um número maior de corpos celulares (Figura 42F) que não conseguiram completar a citocinese. Juntos, estes resultados demonstram que a diminuição nos níveis de AdKAP7 causa problemas no metabolismo e na replicação correta do kDNA de *A. deanei* após tratamento com radiação ultravioleta.

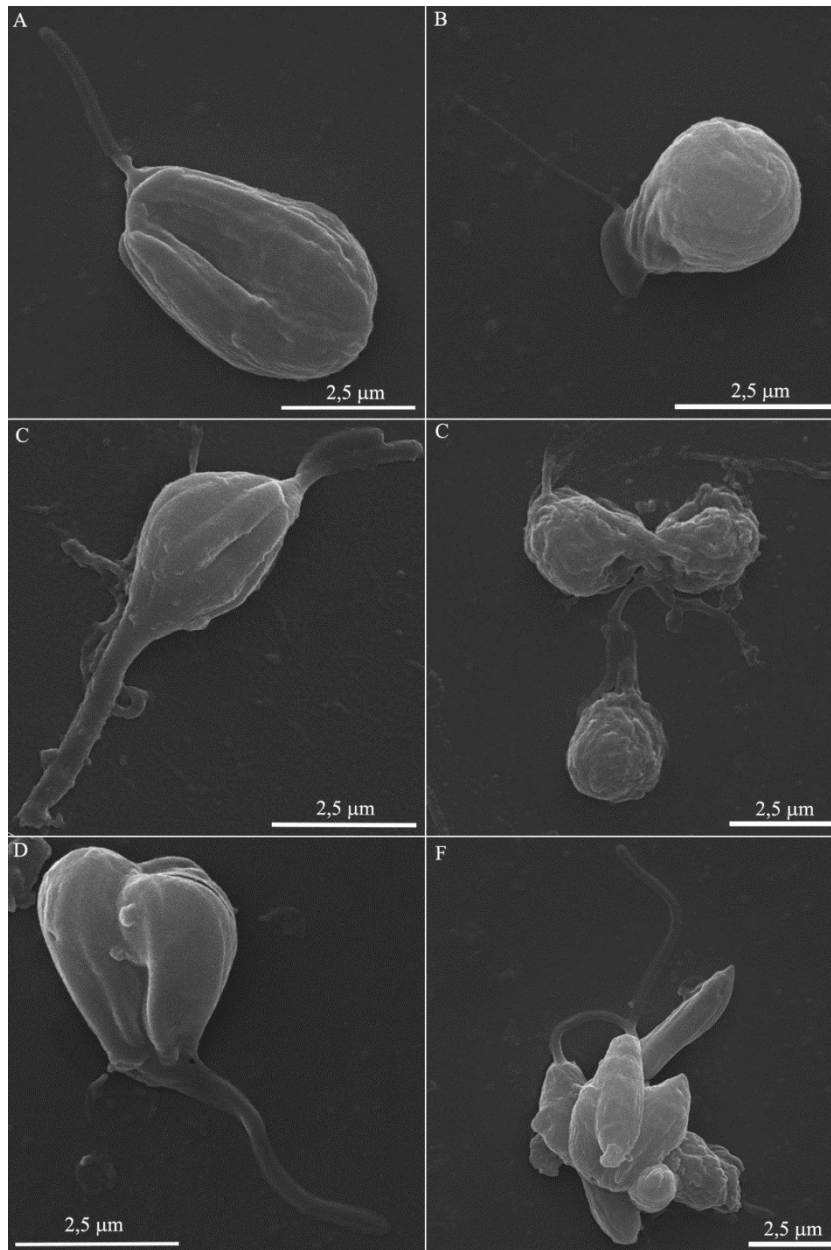


Figura 42 - MEV de células heminocautes para AdKAP7 irradiadas com $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UV – Microscopia representativa de fenótipos observados após irradiação com radiação UV. Após 12 horas é possível se observar células com vários formatos distintos do esperado para *A. deanei*. Parasitos apresentam problemas de replicação após a geração de danos ao DNA, chegando a fenótipos extremos de problemas de replicação como os observados em C e F.

5. Discussão

Desde o início dos estudos sobre o reparo de DNA é descrito que o reparo de DNA mitocondrial pode possuir características distintas do reparo nuclear. Algumas

vias, como a via do NER, foram descritas como ausentes nas mitocôndrias de células de eucariotos superiores (Figura 11) (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974; PASCUCCI *et al.*, 1997; PODRATZ *et al.*, 2011). A descrição do reparo mitocondrial ainda é incompleta e apenas alguns estudos tentam investigar o metabolismo de DNA da organela.

Proteínas do BER já foram descritos na mitocôndria de diversos organismos em trabalhos com mais de três décadas (ANDERSON; FRIEDBERG, 1980; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2006; PETTEPHER *et al.*, 1991; PINZ; BOGENHAGEN, 2015). O reparo de quebras de fita dupla também já foi sugerido como atuante nas mitocôndrias de alguns fungos e plantas (MANCHEKAR *et al.*, 2006; MILESHINA *et al.*, 2011; MOREL *et al.*, 2008) enquanto a maquinaria de recombinação básica para a via de reparo por recombinação homóloga e a descrição do processo em mitocôndria de mamíferos já foi feita (THYAGARAJAN; PADUA; CAMPBELL, 1996), embora seja tido como raro (MINCZUK *et al.*, 2011). O reparo por erros de pareamento foi descrito mais recentemente em algumas linhagens de células humanas e de outros mamíferos (DE SOUZA-PINTO *et al.*, 2009; MASON *et al.*, 2003). É interessante ressaltar que as proteínas do MMR nuclear não são localizadas comumente na mitocôndria, sugerindo que talvez vias não canônicas sejam responsáveis pelo metabolismo do DNA mitocondrial (KAZAK; REYES; HOLT, 2012).

Um fator que se torna um complicador no estudo do reparo do DNA mitocondrial é o fato de que as células de mamíferos e eucariotos apresentam mais que uma mitocôndria, fazendo com que muitos dos efeitos sobre seu DNA só sejam percebidos quando atingem uma quantidade significativa delas. Níveis distintos de heteroplasmia estão relacionados com o surgimento ou não de determinados fenótipos (KOPINSKI *et al.*, 2019) e a heteroplasmia destas células pode ser um fator de complicação no estudo de vias de reparo de DNA mitocondrial. O fato de que *Trypanosoma cruzi*, assim como outros membros da ordem Kinetoplastida, apresentarem uma mitocôndria única, ainda que modificada, faz com que eles sejam ótimos modelos para o estudo do reparo de DNA mitocondrial.

Dentre os agentes genotóxicos aos quais os organismos estão expostos, o estresse oxidativo constitui, senão a principal, uma das mais relevantes fontes de dano a biomoléculas. Durante a infecção de *T. cruzi* em células de mamíferos, ROS

são as principais fontes de problemas na fase amastigota intracelular do ciclo de vida do parasito e diversos estudos já focaram em como o parasito lida com estes insultos (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016; PAIVA *et al.*, 2012; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018; PIACENZA *et al.*, 2009).

Já foi descrito que a resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi* envolve várias barreiras metabólicas criadas pelo parasito para lidar com o dano gerado pelas ROS. A primeira linha de defesa do parasito é composta por enzimas antioxidantes para lidar com o estresse oxidativo, tais como TcAPX, TcCPX, TcMPX, TcSH e proteínas da família das SOD dismutases (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016; PIACENZA *et al.*, 2007, 2009; PIACENZA; TRUJILLO; RADI, 2019).

Dada a importância do estresse oxidativo para *T. cruzi*, outra via que seria lógica de se esperar encontrar na mitocôndria do parasito é a síntese translesão, capaz de realizar o *by-pass* de lesões que causem a parada da replicação mitocondrial. De fato, já foi demonstrado que as polimerases β -PAK, κ e η de *T. cruzi* contam com a capacidade de catalisar a polimerização frente à 8-oxodG (DE MOURA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2008; RAJÃO *et al.*, 2009). A superexpressão destas proteínas aumentaram também a resistência ao BZ, medicamento relacionado com a oxidação do pool de nucleotídeos do parasito (RAJÃO *et al.*, 2014).

Com relação ao metabolismo de DNA, ROS que escapem da atuação do sistema antioxidante do parasito são capazes de alterar o DNA do parasito. Como já foi dito anteriormente, a principal alteração causada pelas ROS no DNA é a modificação da guanina em 8-oxoguanina. Diversas vias de reparo já foram relacionadas com o estresse oxidativo (MELIS; VAN STEEG; LUIJTEN, 2013; NEMZOW *et al.*, 2015), porém a principal via responsável por este tipo lesão é o sistema GO, uma subvia do BER.

Como visto anteriormente (FURTADO *et al.*, 2012) e neste trabalho (Figura 16), os níveis de lesão no kDNA de *T. cruzi* permanecem estáveis mesmo após insultos com altas doses de peróxido de hidrogênio. Já foi descrito que a presença de várias proteínas capazes de gerar estresse oxidativo devido ao escape de radicais da cadeia transportadora de elétrons é contrabalanceada com a presença, na própria organela, de enzimas capazes de lidar com estas ROS (MAILLOUX, 2018). Das enzimas envolvidas na resposta contra ROS de *T. cruzi*, a proteína TcMPX foi localizada na

mitocôndria. Esta proteína pertence à família das perorredoxinas e catalisa a detoxificação de peróxido de hidrogênio (WILKINSON *et al.*, 2000) e peroxinitrito (PIÑEYRO *et al.*, 2008), numa reação que não é importante para o processo de invasão celular, mas sim para o curso da Doença de Chagas (PIACENZA *et al.*, 2008). O nível constante de danos, que varia entre 1 dano/10kb e não vai muito abaixo de 0,5 dano/10kb, talvez esteja relacionado então com a capacidade inata do parasito de evitar danos ao DNA mitocondrial a partir da presença de proteínas antioxidantes próprias no cinetoplasto. Assim, as doses utilizadas não são capazes de causar grandes problema na organela. Trabalhos de nosso grupo utilizam doses que variam de 100µM à 300 µM e não são capazes de causar grandes quantidades de danos ao kDNA de *T. cruzi* (AGUIAR *et al.*, 2013; FURTADO *et al.*, 2012; KUNRATH-LIMA *et al.*, 2017; RAJÃO *et al.*, 2014).

Com um aumento de dose, para além dos 300µM utilizados no trabalho, os efeitos em outros processos do metabolismo e em outras localizações subcelulares seriam tão altos que a célula se tornaria inviável. Desta forma, o ensaio de qPCR de danos causados pelo peróxido de hidrogênio não é a capaz de detectar níveis de lesões muito altos no kDNA do parasito. Importante ressaltar que as mudanças metabólicas causadas pelo ROS são amplas e não se resumem somente à atuação destas enzimas (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016).

Com relação ao metabolismo de DNA, as duas proteínas chaves após a incorporação da 8-oxodG no DNA são as proteínas TcOGG1 e TcMYH. Estudos com o superexpressor do homólogo de OGG1 em *T. cruzi*, denominado TcOGG1, demonstraram que esta enzima atua na resposta ao estresse oxidativo e que níveis altos de TcOGG1 tornam a célula mais sensível ao estresse oxidativo, ao mesmo tempo que diminuem os níveis de 8-oxoguanina tanto no núcleo quanto na mitocôndria, em comparação com o controle (FURTADO *et al.*, 2012).

Neste trabalho demonstramos que TcMYH está envolvida no metabolismo tanto nuclear, quanto mitocondrial. A localização mitocondrial de MYH já foi descrita em células de mamíferos, apesar de em nenhuma destas descrições a proteína ser exclusivamente mitocondrial ou nuclear (ICHINOE *et al.*, 2004; NAKABEPPU, 2001; TAKAO *et al.*, 1999). TcMYH foi demonstrada como tendo uma localização ubíqua

pelo corpo celular do parasito (KUNRATH-LIMA, 2013) e nós quantificamos o efeito da superexpressão desta enzima em *T. cruzi*.

A superexpressão desta proteína levou à uma maior sensibilidade do parasito à agentes relacionados com estresse oxidativo (Figura 14). Este resultado poderia estar relacionado com a função desta enzima, retirar a adenina pareada de forma errada em frente à 8-oxodG e gerar um sitio AP, capaz de levar à morte celular em altos níveis (WILSON; BOHR, 2007). De fato, quando verificamos os níveis de sítios AP nesse superexpressor (Figura 15) foi visto que *T. cruzi* realmente existe um acúmulo de sítios AP após 30 minutos do início do tratamento com peróxido de hidrogênio, mas o mais marcante foi que o superexpressor desta proteína possui níveis mais altos de sítios AP, em comparação com a célula selvagem, em quase todos os pontos analisados. O homólogo de MutY em humanos já foi descrito como uma enzima relacionada à morte celular. O mecanismo pelo qual esta morte ocorreria envolveria, em células de mamíferos, a geração de filamentos de fita simples devido ao sítios AP gerados pela ação de MYH (MARKKANEN; DORN; HÜBSCHER, 2013). A morte observada e este alto nível de sítios AP observados pode estar relacionado com o desbalanço do sistema de reparo devido à superexpressão de TcMYH. Em condições normais, como demonstrado pelos níveis medidos na cepa controle, ocorre um aumento na quantidade de sítios AP da cepa selvagem, com pico em 1 hora após o tratamento. Os níveis mais altos em quase todos os pontos analisados, e o pico mais rápido observado para o superexpressor pode ser devido ao fato de que a superexpressão é feita a partir de um vetor integrativo de expressão constitutiva. Desta forma, o parasito se encontra sempre apto a reconhecer e fazer a clivagem do pareamento errado da adenina frente à 8-oxodG, levando à um pico precoce e a níveis maiores durante todo o tempo de acompanhamento.

A quantificação dos sítios AP foi feita a partir da utilização do DNA total do parasito, em uma extração que não é diferencial para o DNA nuclear e mitocondrial. Desta forma não representa o metabolismo exclusivo do núcleo ou do cinetoplasto. Foram feitas tentativas de centrifugação para a separação dos DNAs das duas organelas para utilização tanto na quantificação de sítios AP quanto na quantificação por qPCR de fragmento longo, porém não foram obtidas amostradas purificadas para cada uma das organelas. O teste com primers para regiões específicas tanto do núcleo quanto do cinetoplasto de *T. cruzi* demonstraram que havia DNA contaminante

em todas as amostras. Portanto, a quantificação de sítios AP representa a quantidade total de sítios AP encontrados em cada cepa após o tratamento.

Nós verificamos também a cinética de reparo a partir de qPCR de fragmento longo, já que a utilização de primers específicos nos permite analisar cada um dos dois genomas (Figura 16). Fica claro que, na análise dos níveis de lesões nucleares, a superexpressão de TcMYH teve uma clara influência no nível de lesões encontradas no núcleo do parasito. No cinetoplasto, porém, os níveis encontrados de lesão foram mais constantes ao longo do tempo, ficando em níveis menores que os nucleares nos tempos analisados logo após o tratamento. Estes resultados corroboram as localizações observadas para a proteína superexpressa, que se encontra tanto no núcleo quanto no cinetoplasto do parasito (KUNRATH-LIMA, 2013), e também são condizentes com a hipótese de que a presença de proteínas antioxidantes talvez consiga evitar grande parte das lesões no kDNA do parasito. Interessante ressaltar que a única diferença significativa observada na cinética de reparo do cinetoplasto se deu no ponto de 30 minutos. Foi neste ponto que também observamos o pico no número de sítios AP do parasito superexpressor (Figura 15). Este dado também se correlaciona com a observação de que a sobrevivência do superexpressor é menor logo após o tratamento com Mt-OX (Figura 14), sugerindo que a morte observada também pode ser devido aos danos causados na mitocôndria do parasito.

Vale ressaltar que a técnica possui limitações. A amplificação de um fragmento de 10kb é feita devido à chance estatística de se encontrar uma lesão em um fragmento com este tamanho e a facilidade técnica de se amplificar este fragmento. Porém, como o ensaio se baseia na parada da DNA polimerase de alta fidelidade frente à uma lesão, o valor encontrado pode ser subestimado, já que existe a possibilidade de uma mesma fita ter mais de um dano e, dessa forma, apenas o primeiro seria detectado no ensaio. Dessa forma, aumentar o fragmento amplificado não significaria num aumento da sensibilidade da técnica. Além disso, existe a perda de células causada pela morte causada devido à ação dos agentes genotóxicos. Estas células são perdidas nesta análise e, embora seja evidente a existência do reparo destas lesões, outras técnicas podem apontar cinéticas distintas de reparo.

Durante a resolução dos efeitos do estresse oxidativo pelo BER, é necessário realizar a limpeza do local do dano (atividade de DRP-liase) seguido da inserção do

nucleotídeo correto na ponta 3'-OH do sítio AP gerado. Em alguns organismos a enzima capaz de catalisar tanto a atividade de DRP-liase quanto a inserção do nucleotídeo é a DNA polimerase β (ALLINSON; DIANOVA; DIANOV, 2001). Foi demonstrado que, em *T. cruzi*, esta proteína também se encontra presente e capaz de realizar estas atividades (LOPES *et al.*, 2008; SCHAMBER-REIS *et al.*, 2012). Foi demonstrado também que esta proteína é capaz de lidar com lesões oxidativas no cinetoplasto e que sua localização subcelular é dependente das fases do ciclo celular. Também foi demonstrado que, frente a um insulto oxidativo, esta proteína se transloca para os sítios antipodais do parasito (SCHAMBER-REIS *et al.*, 2012). Ligases mitocondriais já foram descritas em *T. brucei* (DOWNEY *et al.*, 2005), porém nenhum estudo ainda foi feito em *T. cruzi*.

Todos estes resultados demonstram que *T. cruzi* possui, no cinetoplasto, proteínas capazes de lidar com muitas das etapas do reparo e da tolerância ao dano causado pela de 8-oxoguanina (Figura 43). A alteração nos níveis de lesões e 8-oxodG na organela encontradas com a superexpressão das DNA glicosilases (FURTADO *et al.*, 2012; KUNRATH-LIMA, 2013), a translocação da DNA polimerase β frente à presença de estresse oxidativo (SCHAMBER-REIS *et al.*, 2012) e a presença de DNA polimerases de síntese translesão capazes de catalisar a polimerização frente à 8-oxodG no cinetoplasto constroem um cenário no qual o parasito de fato possui uma resposta completa contra os efeitos no DNA mitocondrial do estresse oxidativo. Interessante ressaltar que a enzima catalase, descrita em diversos organismos como sendo chave na resposta ao estresse oxidativo, está ausente em *T. cruzi* e que esta ausência talvez esteja relacionada com o processo de infecção do parasito (FREIRE *et al.*, 2017), criando um cenário no qual o parasito tem que ser capaz de sentir o estresse oxidativo afim de continuar seu ciclo, mas tem que ter proteções contra os efeitos mutagênicos do mesmo.

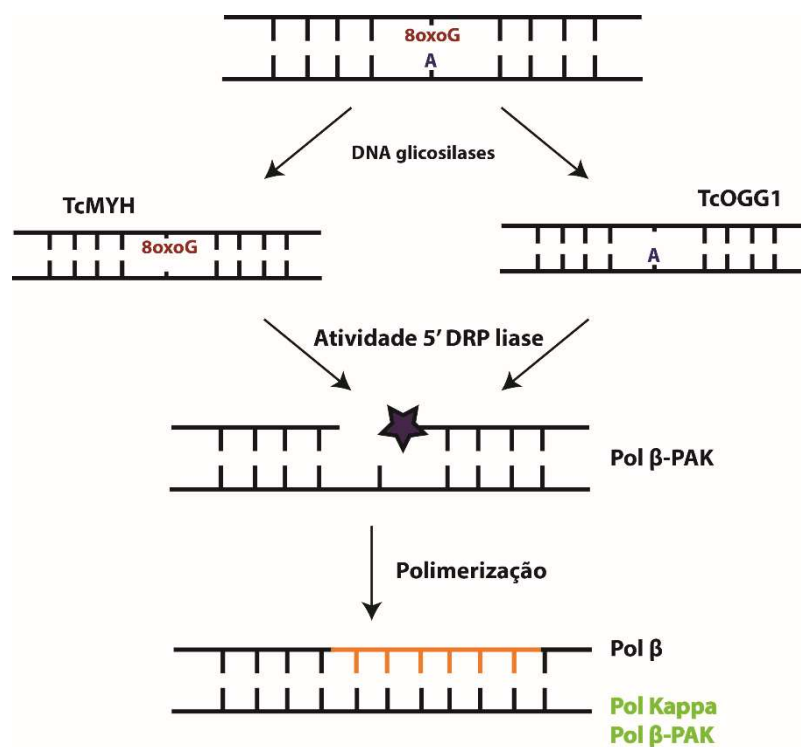


Figura 43 – Proteínas envolvidas na resposta à 8-oxoguanina já descritas no cinetoplasto de *T. cruzi* – Trabalhos de nosso grupo já demonstraram que existem proteínas para quase todas as etapas da tolerância e remoção da 8-oxoguanina do kDNA de *T. cruzi*. TcMYH e TcOGG1 são capazes de identificar tanto a base modificada, quanto a adenina incorporada de forma errada no kDNA; Polβ-PAK possui atividade de 5' DRP liase, ou seja é capaz de limpar o esqueleto de açúcar fosfato do local da lesão; Polβ é capaz de catalizar a polimerização de DNA frente a locais de lesão ; Polβ e Polκ são capazes de atuar como polimerases translesão e permitir a tolerância da lesão em filamentos de DNA (em verde na figura).

Apesar de *T. cruzi* possuir enzimas e proteínas que permitem a construção, no cinetoplasto, de uma via capaz de detectar, reparar e tolerar os danos causados pela 8-oxoguanina, a principal consequência do estresse oxidativo no DNA, não foi determinado ainda se outras vias de reparo também se encontram no cinetoplasto do parasito. Visto que temos identificado algumas respostas contra estresse oxidativo já caracterizadas na mitocôndria de *T. cruzi*, nossa outra abordagem foi investigar se uma proteína específica do cinetoplasto de tripanossomatídeos pode estar envolvida com o reparo de DNA nesta organela.

Como dito anteriormente, uma família importante para o metabolismo do kDNA nos tripanossomatídeos é a família das proteínas KAP. Em nosso trabalho, das seis

possíveis proteínas desta família já identificadas em *T. cruzi*, escolhemos trabalhar com a proteína TcKAP7. A escolha da proteína TcKAP7 se deu após a análise da sequência e de seus domínios. Como mostrado na Figura 17, esta análise demonstrou a existência de um domínio de ligação ao DNA denominado HMG-box. O domínio HMG-box é característico de proteínas de ligação ao DNA e é dividido em três classes diferenciadas devido à sua estrutura: HMG-box da família dos nucleossomos; HMG-box da família dos ganchos AT; e a família HMG-box (ŠTROS; LAUNHOLT; GRASSER, 2007). De forma geral, este domínio apresenta três α -hélices com uma curvatura em forma de L e a presença de aminoácidos positivos nestas hélices organizados de forma que possam interagir com o DNA (LAUDET; STEHELIN; CLEVERS, 1993). O domínio encontrado na proteína TcKAP7 foi o da família HMG-box. Em leveduras e células de organismos multicelulares estes domínios estão presentes em proteínas que englobam diversas funções, desde funções de remodelamento de cromatina e controle transcricional, a funções de reparo de DNA (ÁNGEL *et al.*, 2017; LAUDET; STEHELIN; CLEVERS, 1993; ŠTROS; LAUNHOLT; GRASSER, 2007).

Em nossos experimentos com TcKAP7, vimos que o tratamento das células com MMS não demonstrou diferença de sobrevivência entre as cepas (Figura 20) nem de replicação, já que o crescimento das duas cepas foi semelhante (Figura 19). Dentre as lesões causadas por MMS é descrito que o agente é capaz de causar problemas de replicação (VESELA *et al.*, 2017). O crescimento não alterado da cepa nocaute para TcKAP7 em comparação com a cepa selvagem sugere que TcKAP7 não esteja envolvida com a replicação do kDNA em situações de estresse replicativo.

De fato, quando observamos a resposta do parasito ao berenil, um agente também capaz de causar problema de replicação por se ligar no sulco menor da dupla fita de DNA (ZUMA *et al.*, 2014) foi visto que, apesar de alcançar um platô menor no crescimento após tratamento com a droga (um fenótipo visto em vários tratamentos genotóxicos desta cepa), as células apresentam uma cinética de crescimento semelhante. Além de problemas no crescimento, um dos efeitos do berenil é causar o surgimento na população de parasitos com números aberrantes de cinetoplasto (ZUMA *et al.*, 2014). Em nossa quantificação também não vimos níveis estatisticamente diferentes de parasitos aberrantes na população analisada,

reforçando a idéia de que TcKAP7 não está envolvida com problemas de replicação no kDNA.

A presença de um domínio de ligação ao DNA; o comportamento semelhante relacionado aos problemas de replicação causados pelo MMS e pelo berenil; a falta de diferença na cinética de crescimento da célula nocaute em condições normais (que pode ser visto nos controles das curvas de crescimento apresentadas); juntamente com a localização desta proteína nos sítios antipodais do parasito (MORINI, 2015) - sítios já descrito como locais de reparo de kDNA do parasito (JENSEN; ENGLUND, 2012) - sugerem que esta proteína esteja envolvida com outros processo do metabolismo do kDNA, além do controle da replicação.

Os estudos das proteínas associadas ao cinetoplasto ainda não conseguiu elucidar muitas de suas funções. Em *Crithidia fasciculata* foi demonstrado que a proteína CfKAP1 se assemelha a histonas e atua na condensação de redes isoladas de kDNA, ajudando na estabilização da estrutura do disco de kDNA. O nocaute desta proteína leva à anormalidades na replicação do kDNA, um fenótipo que consegue ser restaurado com a reintrodução da proteína neste parasito (LUKEŠ *et al.*, 2001). Neste mesmo parasito foi visto que o nocaute de CfKap2 e CfKap3 aumentam a expressão de genes de proteínas do maxicirculo, indicando uma função para estas proteínas no controle de expressão gênica de proteínas do cinetoplasto (AVLIYAKULOV; LUKEŠ; RAY, 2004). Interessantemente, o nocaute de TcKAP3 não apresentou fenótipo aparente com relação ao metabolismo de DNA, indicando que estas proteínas podem ter funções distintas dependentes do organismo ou que a busca por homologia não possa ser uma forma confiável de se identificá-las.

Em nossos experimentos foi visto que o nocaute de TcKAP7 possui uma resistência maior à peróxido de hidrogênio em uma alta concentração de peróxido de hidrogênio. Como já dito anteriormente, a resposta ao estresse oxidativo é de suma importância para *T. cruzi*, porém a única diferença foi vista quando o parasito foi tratado com 300µM de peróxido de hidrogênio. Se as especulações de que o peróxido atua de forma mais significativa no núcleo é correta, simplesmente porque o núcleo corresponde a cerca de $\frac{3}{4}$ do DNA total do parasito, e de que o parasito, assim como descrito para outros organismos, tenha uma maquinaria antioxidante ativa no cinetoplasto, é de se esperar que apenas em doses altas nós consigamos ver uma

diferença no nocaute de TcKAP7. Em doses mais baixas o núcleo seria o principal afetado e apenas com o aumento para 300µM somos capazes de ver uma influência no metabolismo do DNA mitocondrial.

Foi devido a este fato que utilizamos o reagente Mt-OX também em nossos experimentos com TcKAP7. Assim como no peróxido de hidrogênio, vimos que TcKAP7 também se torna mais resistente à dose mais alta do reagente utilizada. Em comparação com células humanas no trabalho que descreveu a função deste agente, a dose utilizada em *T. cruzi* é 4 vezes maior (WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Vimos que o nocaute de TcKAP7 tem uma resistência maior ao Mt-OX quando comparado com a cepa selvagem 30 minutos após o tratamento com a droga. Especulamos que após o tratamento com Mt-OX em uma dose alta pode ocorrer a liberação de espécies reativas de oxigênio devido ao efeito na organela, e estes radicais livres seriam então capazes de afetar o núcleo da célula. Apesar de não termos visto diferença no potencial de membrana após o nocaute de TcKAP7, é possível que a célula mutante tenha algum tipo de alteração e tenha se adaptado de forma a estar mais preparada para lidar com os efeitos do estresse oxidativo mitocondrial. A fim de confirmar isto seria interessante fazer a verificação da perda de potencial de membrana tanto em células mutantes quanto selvagens após tratamento com Mt-OX além de um acompanhamento mais detalhado da sobrevivência da célula nas primeiras 24 horas.

Considerando este resultado que indica uma maior resistência de TcKAP7 após tratamento com Mt-OX especulamos que a ausência de TcKAP7 esteja envolvida em controles do processo de transcrição mitocondrial, em uma via que poderia ser semelhante ao NER nuclear. O envolvimento de proteínas do NER com o estresse oxidativo já foi descrito, como o papel das proteínas CSA e CSB na manutenção do DNA mitocondrial de células humanas (D'ERRICO *et al.*, 2013; PASCUCCI *et al.*, 2011). Também foi descrito que a proteína CSB pode atuar no controle do processo de mitofagia para prevenir o acúmulo de danos e mutações ao DNA mitocondrial (SCHEIBYE-KNUDSEN *et al.*, 2012). Estes resultados demonstram que uma proteína do NER associado à transcrição é capaz de atuar na resposta ao estresse oxidativo, ainda que, na mitocôndria, é possível que sua função não seja relacionada com a resolução direta do dano. Dessa forma, é possível que TcKAP7 também atue em

alguma via associada ao reparo e à transcrição e que seu nocaute tenha sido capaz de alterar a resposta ao estresse oxidativo destes mutantes.

Um dos grandes marcos dos estudos de reparo de DNA foram o isolamento de células mutantes para genes da via de reparo por excisão de nucleotídeos e, portanto, o dano causado por este agente genotóxico é um dos mais bem descritos e estudados atualmente (FRIEDBERG *et al.*, 2006). Em células de mamífero é clássica a descrição desde a década de 1970 de que o reparo de lesões causadas por radiação UV, classicamente feito pelo NER, é ausente nas mitocôndrias (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974). Outros trabalhos também demonstraram que o reparo de danos causados por cisplatina, outro tipo de dano preferencialmente relacionado com a via do NER, também é ausente nas mitocôndrias de mamíferos (PODRATZ *et al.*, 2011).

As primeiras investigações da resposta contra radiação UV demonstraram que bactérias expostas a radiação UV e depois colocadas em contato com a luz solar eram capazes de se recuperar mais rapidamente que aquelas deixadas no escuro. Estes experimentos levaram à descrição, anos depois, do mecanismo da fotoliase (DULBECCO, 1949; KELNER, 1949). Porém, mesmo sem exposição à luz solar, as células dos diversos organismos já estudados são capazes de realizar o reparo de danos causados por UV e esta via de reparo hoje é conhecida como o NER.

T. cruzi possui sequências candidatas à homólogas de fotoliase. Um estudo com a expressão heteróloga de um destes possíveis homólogos, demonstrou que esta proteína é expressa na forma epimastigota e está presente nos sítios antipodais do parasito, porém não foi feita sua caracterização funcional (CAROLAING GABALDÓN *et al.*, 2010). Em nosso grupo foi visto que não existe diferença entre o nível de lesão e a cinética de reparo entre células irradiadas que estão em contato com a luz ou não, indicando que possivelmente o reparo deste tipo de lesão deva ser feito exclusivamente pelo NER ou outras vias de reparo independentes da luz (MENDES, 2015). Porém, especulamos que, devido à característica única do cinetoplasto dos membros da ordem Kinetoplastida, incluindo aí os tripanossomatídeos, estes parasitos necessitam então de uma maneira de lidar com os danos volumosos causados no DNA.

Em nosso trabalho nós vimos que o nocaute de TcKAP7 faz com que a célula seja mais sensível ao dano causado por radiação ultravioleta, tanto de forma imediata,

quanto em tempos maiores. A morte imediata maior no mutante fica evidente quando se analisa a porcentagem de células em necrose e a porcentagem de células determinadas com quantidade de DNA descrita como SubG1, maior quando em comparação com a célula selvagem, indicando que níveis menores de TcKAP7 prejudicam a resposta à radiação UV. Um dos efeitos da radiação ultravioleta é a morte imediata causada pela parada da RNA polimerase e sinalização para a morte. Na busca por homologia de TcKAP7 foi visto que uma das proteínas que possuem similaridade com ela é o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), proteína já relacionada com a resposta ao dano de DNA (ZHANG; WANG, 2018). Já foi descrito que o nocaute desta proteína, em células tumorais é acompanhado pela redução dos níveis de uma proteína denominada E2F1 (JIANG; WANG, 2019). Esta proteína E2F1 está diretamente ligada com a resposta à radiação ultravioleta, já que seus níveis são diretamente relacionados com a estimulação do reparo de DNA (BISWAS; MITCHELL; JOHNSON, 2014). É possível então que TcKAP7 atue como um fator de estimulação ou controle das vias de reparo na mitocôndria.

Em nossos experimentos foi visto que a expressão de TcKAP7 após irradiação com radiação UV na célula selvagem segue um padrão de crescimento até 24 horas. De fato, trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que, apesar de não ser capaz de retirar todas as lesões causadas por radiação UV no núcleo nas primeiras 24 horas, *T. cruzi* é capaz de reparar parte delas (RAJÃO, 2011). Curiosamente, foi demonstrado que o reparo de lesões mitocondriais causadas por UV talvez seja mais eficiente no cinetoplasto de *T. cruzi* do que no núcleo do parasito. Também chama a atenção que até mesmo 24 horas depois, um ciclo de replicação do parasito, os danos causados pela radiação UV persistem no genoma total do parasito, indicando que o parasito é capaz de tolerar a presença destes danos (MENDES, 2015).

Nossos experimentos de *Western blot* demonstraram que a cinética de expressão de TcKAP7 se correlaciona com esta cinética de reparo observada na literatura e na Figura 31. Este resultado implicaria que TcKAP7 está envolvida diretamente na resposta à este tipo de dano ao DNA, embora não possamos determinar qual a função que ela exerce. Estes resultados vão em um caminho contrário ao da descrição clássica de que não ocorre remoção de dímeros de

pirimidina na mitocôndria de células de mamífero (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974).

Com relação à morte imediata, nosso grupo já demonstrou e é descrito na literatura que vias de sinalização fazem parte da resposta ao dano de DNA e que a cafeína é um importante inibidor desta resposta. Assim como observado em outro trabalho (MENDES, 2015) a inibição com cafeína foi capaz de aumentar a sobrevivência tanto da célula nocaute para TcKAP7 quanto da célula selvagem. Porém, quando foi utilizado o inibidor para ATR observamos que as células selvagens têm uma porcentagem maior de sobrevivência que as células mutantes nesta mesma condição. No caso dos mutantes, a diferença observada entre os valores de sobrevivência após tratamento com cafeína (97,22%) e com o inibidor de ATR (75,55%) são significativamente diferentes. O tratamento com cafeína tem diversos efeitos, além da inibição não específica das vias de ATM/ATR após irradiação com UV, efeitos estes que envolvem também controle do ciclo celular (BODE; DONG, 2007; KERZENDORFER; O'DRISCOLL, 2009; WANG, SHAO WIN *et al.*, 1999). A diferença observada entre os tratamentos com ATR e cafeína na célula mutante, e que não é observada na célula selvagem, pode indicar que existe diferença na sinalização entre o dano nuclear e o dano mitocondrial. Como esperado, em nenhuma das células foi visto recuperação de morte causada pela inibição de ATM.

O salvamento visto pela inibição de ATR pode ser, em parte, devido à inibição das vias de sinalização para a morte que tenham origem devido aos danos causados no núcleo do parasito. Este fenótipo já foi observado em outros trabalhos do grupo que demonstraram que esta sinalização inicial tem relação com os processos de transcrição e com o reparo de excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição (TC-NER) (MENDES, 2015). Existe uma diferença, porém, na porcentagem de sobrevivência observada após inibição prévia da proteína ATR e subsequente irradiação com radiação UV, o que pode sugerir uma via de sinalização dependente de ATR devido à danos causados no cinetoplasto.

De fato, já foi descrito que ATR pode ter um papel no salvamento de danos de origem mitocondrial. Em células de queratinócitos foi demonstrado que uma forma de ATR é capaz de interagir com a membrana externa da mitocôndria a partir da inativação de Pin1 causada pela radiação UV. Esta inativação levaria à ligação de

ATR na membrana externa da mitocôndria, impossibilitando a atuação de ATR na sinalização para morte. Esta interação, então, pode levar à uma cascata antiapoptótica mediada pela proteína Bid. A partir do controle de proteínas da família BCL-2, provocado por esta cascata, a célula é capaz de controlar a liberação de citocromo C e outros fatores apoptóticos (HILTON *et al.*, 2015). *T. cruzi* apresenta um possível homólogo da proteína Pin1, porém a via de ativação via BCL-2 é modificada neste parasito. Dessa forma, uma possibilidade é que a inibição de ATR poderia ter um efeito semelhante ao causado pela inativação de Pin1 por radiação UV em condições selvagens. Importante ressaltar que, como a radiação UV atinge os dois conjuntos de genoma, o balanço entre o fator antiapoptótico de Pin1 e apoptótico de sinais de dano nuclear que determinaria o caminho escolhido pela célula.

Uma das questões que permeiam alguns trabalhos de nosso grupo de pesquisa diz respeito às vias de morte que *T. cruzi* aciona frente a cada tipo de dano causado no DNA. Em um trabalho recente foi visto que o tipo de morte causada por tratamentos com radiação ionizante se difere daquele causado por radiação UV. Foi demonstrado que a resposta de morte desencadeada por *T. cruzi* também é dependente da dose utilizada (ASSIS, 2019). Em nossos experimentos também foi visto que a radiação UV causa, imediatamente, morte a partir da exposição de fosfatidilserina, indicativa de morte sinalizada por apoptose. Surpreendentemente, foi visto que o nocaute de TcKAP7 alterou a sinalização detectada para uma que se assemelha a necrose tanto imediatamente quanto 48 horas após o tratamento com radiação UV. Esta diferença de resposta, sugere que o dano ao DNA mitocondrial aciona outras vias de morte que o dano causado no núcleo. Um resultado semelhante foi visto quando foi utilizada uma forma de doxorubicina direcionada para o cinetoplasto (ASSIS, 2019).

A morte por necrose é descrita como sendo acidental, significando que ela é resultante de um dano irreversível e no qual ocorre extravasamento do citoplasma para o meio extracelular (MORRIS *et al.*, 2018). Espera-se de tal morte que ela não seja responsiva à inibição de vias de sinalização, já que uma injúria que lese a membrana celular a ponto de rompê-la não permite que a célula tenha tempo de reagir ou reparar este dano. Porém, já é descrito na literatura que existem vias de necrose direcionadas. Uma destas vias, denominada via de MPTP (do inglês *mitochondrial permeability transition pore*), é determinada pela presença e um poro que permite o extravasamento de fatores mitocondriais de forma independente de BCL-2. A abertura

deste poro depende da presença de cálcio e o controle deste processo pode determinar se uma célula se encaminha por um processo de morte por uma via semelhante à necrose ou à apoptose (GIORGIO *et al.*, 2018; WEBSTER, 2012).

Em *T. cruzi* os estudos de vias de morte sinalizada demonstraram que existem diversas particularidades. Atualmente é proposto que as cascatas de sinalização que são ativadas em vias apoptóticas clássicas não são as mesmas neste parasito. Em *T. cruzi*, por exemplo, existe a ativação de metacaspases, ao contrário das caspases tradicionais de eucariotos superiores. Também não foi demonstrada ainda a ação de proteínas da família BCL-2, embora a descrição de um processo de morte semelhante a apoptose já tenha sido feita a algum tempo (AMEISEN *et al.*, 1996; MENNA-BARRETO, 2019). Mesmo com a ausência de BCL-2, alguns experimentos utilizando inibidores desta via de morte como ciclosporina A e ácido betulínico demonstraram que a via de MPTP pode ser uma via de morte existente no parasito (BUSTOS *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2017).

Nosso ensaio de investigação da via de morte escolhida por *T. cruzi* utiliza-se da detecção da ligação de Anexina V nas porções de fosfatidilserina expostas após o tratamento (um sinal de ativação de via apoptótica) e da detecção da entrada de iodeto de propídeo e ligação do mesmo em ácidos nucleicos (uma marcação que sozinha indicaria uma morte via necrose, e em conjunto com a marcação com Anexina V uma morte pode ser entendida como apoptose-tardia ou irreversível). A marcação por iodeto de propídeo apenas indica que a morte pode ser por uma via de necrose, porém, até 48 horas após esta morte nós observamos esta alta marcação por necrose. Voltando a nossos experimentos de inibição das vias clássicas de DDR, sinalizadas por ATM e ATR, vemos que a inibição com cafeína também é capaz de restaurar quase que a totalidade da sobrevivência tanto da célula selvagem quanto da célula nocaute, ao passo que a inibição de ATR restaura apenas parte desta sobrevivência e a inibição de ATM não tem efeito (Figura 27). Como a cafeína, um inibidor não específico de diversas vias distintas, foi capaz de aumentar a sobrevivência a quase 100% após o tratamento genotóxico, especulamos que a necrose indicada por nossos experimentos com anexina V e iodeto de propídeo não seja uma necrose clássica, mas sim uma via que também permite esta marcação mas é sinalizada e, portanto, passível de inibição. Uma das possibilidades de via de morte feita por TcKAP7KO

após a irradiação é a via de MPTP explicada acima, no qual o poro permitiria a entrada do iodeto de propídeo, porém é uma via metabólica sinalizada.

O último tipo de agente genotóxico testado neste trabalho foi a cisplatina. A cisplatina é um agente quimioterápico utilizado a mais de três décadas no tratamento contra células cancerígenas. Sua capacidade citotóxica é creditada à habilidade de se ligar ao DNA, atacando a posição N7 de purinas e formando adutos de DNA. Estes crosslinks gerados pela cisplatina são capazes de bloquear completamente a transcrição e a replicação celular devido à parada de fatores de transcrição/replicação e polimerases. (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; SIDDIK, 2003; WANG, DONG; LIPPARD, 2005). Ao contrário dos danos gerados por radiação UV, que podem ser tolerados ou ignorados pela RNA polimerase, os danos causados por cisplatina tem alta citotoxicidade.

Em nossos experimentos foi visto que a cepa nocaute para TcKAP7 é mais sensível ao tratamento por cisplatina. A modificação estrutural causada no DNA pela cisplatina já foi descrita como tendo alta afinidade por proteínas com o domínio HMG-box (OHNDORF *et al.*, 1999), portanto uma sensibilidade maior numa célula que não possui uma proteína com este domínio pode ser esperado. De fato, a sobrevivência da célula mutante após tratamento com cisplatina é menor que a sobrevivência da célula irradiada com radiação UV.

Também foi visto que a via de morte que a cisplatina causa é distinta daquela causada pela radiação UV na célula mutante. Na célula selvagem, ambos os tratamentos levam à morte via apoptose, um resultado esperado de acordo com a literatura (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; RASTOGI *et al.*, 2010). Porém, a célula mutante apresentou um comportamento diferente daquele observado com radiação UV. Enquanto as células nocaute apresentaram uma morte semelhante a necrose após a irradiação, a morte por cisplatina seguiu por uma via semelhante a apoptose, como descrito para células de câncer (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010).

O fato de TcKAP7 ter homologia com TFAM, junto da morte rápida e reversível por inibidores de ATR e cafeína após tratamento com radiação UV, nos levou a hipotetizar, como dito anteriormente, que esta morte é decorrente de uma sinalização para morte causada pelo dano associado com a transcrição. Neste cenário, ver a perda da sinalização para apoptose no nocaute de TcKAP7 indicaria uma função

atrelada ao metabolismo de DNA que envolve vias acopladas à transcrição. A principal diferença nas vias de morte observadas no tratamento com cisplatina e radiação UV se dá na forte sinalização para apoptose observada após o dano com a cisplatina.

Uma possível explicação para esta diferença observada está no tipo de lesão causada por cada um dos agentes genotóxicos. Como dito anteriormente, dentre os danos causados pela radiação UV está o CPD. A RNA polimerase é capaz de inserir dois ribonucleotídeos frente ao CPD, inserindo uma adenina de forma não-dependente do molde, para então inserir um outro nucleotídeo de acordo com o molde. Caso a RNA polimerase insira outra adenina no local do dano, ela é capaz de retomar a transcrição em um processo livre de erros para o mRNA (WALMACQ *et al.*, 2012). De fato, nosso grupo já sugeriu que este processo de tolerância no processo de transcrição também pode estar presente na forma sanguínea de *T. brucei* (MACHADO *et al.*, 2014). O dano causado por cisplatina, porém, causa sérias distorções na dupla hélice de DNA (HUANG, HUIFANG *et al.*, 1995; OHNDORF *et al.*, 1999) e poderia não ser tolerado pela RNA polimerase. Dessa forma, na célula nocautada para TcKAP7 tratada com cisplatina nós supomos que a sinalização dos danos causados no núcleo seja predominante e justifique o alto sinal apoptótico.

A cinética do reparo descrita para cisplatina chama muito a atenção. Enquanto foi descrito na literatura que o reparo de danos causados por cisplatina parece ausente na mitocôndria de neurônios (PODRATZ *et al.*, 2011), tanto neste trabalho quanto nos experimentos de Rajão, 2011, vemos um rápido reparo dos danos causados por cisplatina no cinetoplasto de *T. cruzi*. Em até 1 hora após o fim do tratamento com cisplatina, os níveis de danos encontrados são quase todos reparados (visto na Figura 11 e na Figura 29). Apesar da descrição de que o metabolismo de cisplatina pode envolver enzimas de metabolismos diversos que visam anular os efeitos da droga no organismo (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010), a diferença entre a cinética das células mutantes e das células selvagem comprovam que existe uma diferença no reparo deste dano no kDNA. É possível que o baixo nível de lesões visto após 24 horas seja devido tanto ao reparo quanto à severidade do dano causado pela droga, já que células que não são capazes de reparar o dano após este tempo não sejam capazes de replicar ou transcrever.

Assim como observado na análise de expressão de TcKAP7 após dano por radiação UV, a expressão da proteína após tratamento com TcKAP7 também é condizente com a cinética de reparo observada. O pico de reparo mitocondrial encontrado no experimento de qPCR se dá com uma hora, que condiz com o pico de expressão de TcKAP7 encontrado. Juntos estes resultados sugerem que TcKAP7 está envolvida diretamente na resposta aos danos causados por cisplatina e radiação UV. Não foi possível determinar se a proteína possui uma função direta no reparo da dupla fita, mas a presença de um domínio de ligação ao DNA, bem como os fenótipos semelhantes a outros mutantes também expostos a estes agentes sugerem que TcKAP7 tem papel no metabolismo decorrente da resolução destes danos.

Tivemos a possibilidade de trabalhar com mutantes para um possível homólogo de TcKAP7 no organismo *Angomonas deanei*. Interessantemente foi visto que, nos primeiros momentos após tratamento com cisplatina os heminocautes de AdKAP7 não foram mais sensíveis à cisplatina em um primeiro momento, porém o crescimento após tratamento com agente genotóxico foi prejudicado nestas células. Após irradiação com radiação UV, este heminocaute foi sensível em um primeiro momento, assim como observado em *T. cruzi* e apresentou crescimento prejudicado após a irradiação, ao passo que o mutante de *T. cruzi* apresentou um fenótipo de morte em tempos tardios. Supomos que o fato do mutante de *A. deanei* ainda possuir uma cópia de AdKAP7 permite que a célula lide com parte do dano gerado por estes tratamentos, ainda que de forma prejudicada, como mostrado pelas formas aberrantes observadas em momentos tardios após a irradiação com radiação UV (Figura 42). Também foi visto que o nocaute de uma cópia de AdKAP7 foi capaz de alterar a condensação do kDNA deste parasito, enquanto o duplo nocaute de TcKAP7 não teve alterações aparentes. Este resultado indica que AdKAP7 talvez esteja relacionada com a organização do kDNA de *A. deanei*.

Como dito anteriormente, foi descrito que as proteínas associadas ao cinetoplasto tem funções distintas na organização e no metabolismo do kDNA, em funções tanto de estrutura e replicação quanto de transcrição (DE SOUZA, SILVANA SANT ANNA *et al.*, 2017; LUKEŠ *et al.*, 2001; WANG, JIANYANG *et al.*, 2014). Os problemas observados após irradiação com UV em *A. deanei* e em *T. cruzi* podem indicar que ambas Kap7 podem estar relacionado tanto com problemas associados com a transcrição quanto com a replicação. De fato, já foi descrito em *T. brucei* que

problemas de transcrição do kDNA podem ocasionar problemas de replicação (GRAMS *et al.*, 2002), uma indicação de que estes dois processos atuam de forma conjunta nesta organela. De fato, após vários ciclos de replicação foi observado, por MEV, formas aberrantes que sugerem problemas na replicação destes parasitos mutantes após irradiação com radiação UV.

Assim como a radiação UV, a cisplatina também é capaz de causar problemas de transcrição e replicação. Quando analisamos as células mutantes para AdKAP7, foi visto que o simples nocaute de uma das cópias deste gene levou à um aumento no número de simbioses filamentosos, um fenótipo bem característico deste parasito ao encontrar problemas de replicação (CATTAPRETA *et al.*, 2015). Quando as células selvagem e mutantes de *A. deanei* foram tratadas com cisplatina, houve um aumento no número de simbioses filamentosos na célula selvagem, e uma diminuição no mutante. Quando foi aumentada a dose da droga, foi visto que a porcentagem de simbioses filamentosos diminuiu tanto na célula selvagem quanto na célula mutante. Com o tratamento com cisplatina, a célula selvagem começa a apresentar este fenótipo, e com o aumento da dose estas células selvagens acumulam tantos erros que entram em alguma via de morte. Desta forma, a diminuição do número de simbioses filamentosos ocorre, pois, os danos gerados ao DNA foram tão severos que estas células morrem e não são vistas em nosso experimento. No caso do mutante, especulamos que a falta de AdKAP7 pode levar a algum tipo de instabilidade que já causa este fenótipo e que o tratamento destas células, mesmo com a menor dose de cisplatina, já é suficiente para causar a morte destas células. Dessa forma, ao analisarmos o número de simbioses filamentosos vemos a diminuição em qualquer uma das doses testadas. Este resultado reforça o papel desta proteína na resposta ao dano de DNA e na geração de problemas de replicação após o dano ao DNA.

Na comparação dos resultados de qPCR dos dois parasitos foi visto que o reparo de cisplatina, em ambos os casos é rápido, porém não foi vista diferença significativa no heminocaute de AdKAP7 em comparação com a célula selvagem, enquanto nocaute de TcKAP7 apresentou maiores níveis de danos ao DNA nos pontos de 6 horas e 24 horas em comparação com a célula selvagem. Uma possibilidade é que o heminocaute de AdKAP7 seja suficiente para lidar com os efeitos

da radiação UV neste parasito ao passo que o duplo nocaute em *T. cruzi* seja mais afetado.

A diferença observada na cisplatina não é significativa e pode estar relacionada ao tipo de dano causado, que é mais severo e capaz de parar a transcrição. Dessa forma, a presença de um alelo a menos torna a célula mutante para AdKAP7 mais sensível, porém não influencia na cinética de reparo observada. De toda forma, as inclinações observadas para *T. cruzi* nestes pontos de tempo são semelhantes entre a célula mutante e selvagem, indicando uma cinética semelhante. Estes resultados podem sugerir que esta proteína pode estar exercendo uma função acessória na resposta ao dano de DNA causada por estes agentes.

De fato, já foi descrito que os danos no DNA mitocondrial e a transcrição de genes da mitocôndria estão relacionados (CLINE, 2012). A influência de proteínas que atuam no reparo associado à transcrição no núcleo em danos causados na mitocôndria, como a proteína CSB, também já foi descrita em células de mamíferos, sugerindo que a organela possui formas de lidar com problemas de transcrição causados pelos danos ao mtDNA (MELIS; VAN STEEG; LUIJTEN, 2013; STEVNSNER *et al.*, 2002).

Nosso grupo verificou que a proteína TcCSB está associada ao metabolismo após danos no kDNA. Utilizando o mesmo peptídeo direcionador que foi utilizado no Mt-OX, foi feita uma modificação de doxorrubicina, uma antraciclina capaz de inibir tanto a transcrição quanto a replicação (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Células superexpressoras e heminocautes para TcCSB foram então expostas à esta droga e foi visto que, em um primeiro momento, a célula heminocaute de TcCSB foi mais sensível ao tratamento, sendo capaz de retomar seu crescimento após 24 horas. Um fenótipo diferente foi visto no superexpressor, no qual não houve sensibilidade maior logo após o tratamento, mas sim uma parada no crescimento após 24 horas (FERREIRA, 2019). Estes resultados sugerem que, no cinetoplasto de *T. cruzi*, existe uma associação entre os processos de transcrição e o reparo de determinados tipos de danos. Não foi possível obter, por homologia, uma predição do modelo da proteína TcKAP7 e investigar possíveis sítios de interação com CSB ou outros fatores de transcrição

mitocondrial, mas acreditamos que os fenótipos observados podem sugerir um papel desta proteína na transcrição mitocondrial após o dano.

Outro ponto interessante diz respeito às diferenças observadas no kDNA após o nocaute de TcKAP7 e a deleção de uma das cópias de AdKAP7. Como descrito por Morini e colaboradores em 2015, o duplo nocaute de TcKAP7 não alterou a organização aparente do disco de kDNA em *T. cruzi*, ao passo que o nocaute de AdKAP7 foi letal para a célula e a deleção de um dos alelos alterou visivelmente a condensação do kDNA (observado na figura 39). Já foi sugerido que o estudo de proteínas associadas ao cinetoplasto tem como dificuldades a alta semelhança entre suas sequências, fazendo com que a nomenclatura destas proteínas sugira que proteínas de nome semelhante tenham funções diferentes. De fato, ao passo que o silenciamento de CfKap3 foi capaz de alterar de forma significativa a expressão, replicação e o crescimento em *C. fasciculata* (AVLIYAKULOV; LUKEŠ; RAY, 2004), nenhum efeito aparente foi descrito para TcKAP3 (SOUZA, FLAVIA SÁ PEREIRA DE *et al.*, 2010) mesmo após tratamento com agentes genotóxicos. Estes resultados podem sugerir que as proteínas podem atuar de formas distintas ou em mais de uma via no mesmo organismo.

Porém, existem pontos em comum na resposta observada nos dois organismos. Tanto em *A. deanei* quanto em *T. cruzi*, foi visto que após os danos terem sido causados os nocautes apresentam menor sobrevivência. Chama atenção o fato de que no caso do duplo nocaute em *T. cruzi* a célula entre em um caminho de morte tardia que não é visto em *A. deanei*. Especulamos que, caso a função de Kap7 seja a mesma nos dois organismos e envolvida com transcrição, a cópia restante de *A. deanei* seja capaz de lidar com parte do dano gerado no metabolismo celular e não seja vista esta morte tardia observada em *T. cruzi*. Também, como foi demonstrado pela MEV, foi observado um fenótipo exacerbado de problema de replicação no mutante de *A. deanei*, principalmente após 4 ciclos depois da exposição à radiação ionizante. Fenótipo também sugerido pelos problemas apresentados pelas imagens de MEV após tratamento com cisplatina. Como já foi dito, em *T. brucei* o silenciamento de uma possível RNA polimerase mitocondrial causa problemas de replicação (GRAMS *et al.*, 2002), uma indicação dos efeitos que a transcrição alterada tem na replicação do parasito. O mesmo poderia acontecer em *A. deanei* e a cópia única, apesar de evitar a morte tardia, não é capaz de reestabelecer a replicação correta do

parasito. De fato, a ausência de uma única cópia de AdKAP7 é capaz de diminuir a sobrevivência à radiação UV e cisplatina no primeiro momento (fenótipo característico de morte sinalizada por problemas de transcrição) e causar um aumento significativo no número de simbioses filamentosos neste organismo, uma indicação que a ausência desta proteína está envolvida com problemas de replicação e transcrição. De forma semelhante, o nocaute em *T. cruzi* poderia estar causando uma morte inicial em processos acoplados à transcrição mitocondrial e a morte tardia observada na radiação UV e parada do crescimento observado frente a cisplatina estariam relacionadas à uma tentativa da célula de sobreviver aos efeitos iniciais destes problemas. Resta analisar por MEV o fenótipo das células de *T. cruzi* após irradiação para verificar a existência de possíveis problemas de replicação nestas células.

As idiosincrasias do metabolismo do DNA mitocondrial de tripanossomatídeos também devem ser levadas em conta na investigação do metabolismo do kDNA. Um exemplo de como a resposta ao dano no DNA de *T. cruzi* é diferente diz respeito à cinética de reparo observada para determinadas lesões, como o MMS. Como dito anteriormente, o MMS é um agente alquilante cuja maioria das lesões causadas são a 7-metilguanina e a 3-metiladenina, sendo a primeira a mais comum das duas, correspondendo a 82% das lesões causadas no DNA pelo MMS (FU; CALVO; SAMSON, 2012). É estabelecido na literatura que a resposta aos danos causados pelo MMS são reparadas majoritariamente pelo BER, sendo a enzima AAG DNA glicosilase central neste processo (FU; CALVO; SAMSON, 2012). Também já foi descrito que esta enzima, em células humanas, também está localizada na mitocôndria e interage com proteínas mitocondriais de ligação à DNA de fita simples (VAN LOON; SAMSON, 2013).

Com os dados disponibilizados do sequenciamento de *T. cruzi*, não é possível localizar nenhum homólogo de AAG DNA glicosilase no parasito, porém, como mostrado na Figura 11, o parasito é capaz de reparar danos causados por MMS tanto na mitocôndria quanto no núcleo (RAJÃO, 2011). Chama a atenção que, na quantificação dos danos mitocondriais causados por MMS, ocorre uma inflexão na cinética de reparo indicando o envolvimento de dois momentos de reparo neste tipo de dano. De fato, outros trabalhos sugerem que o reparo de danos causados por MMS na verdade também pode ser efetuado por proteínas do NER (NIVARD; PASTINK; VOGEL, 1993), uma via de ação rápida que lidaria com os danos no primeiro

momento, de queda rápida do número de danos. Também já foi demonstrado que intermediários do NER podem levar a ativação de vias de recombinação (FU; CALVO; SAMSON, 2012) e, recentemente, um trabalho de nosso grupo demonstrou evidências que sugerem que os danos causados por MMS podem ter envolvimento da proteína TcRad51 nos dois momentos (FERREIRA, 2019). Estes fatos sugerem que o reparo de DNA em *T. cruzi* pode possuir vias distintas das canônicas e que, no reparo do kDNA, pode haver sobreposição de vias distintas para lidar com o mesmo tipo de dano.

Algumas questões, porém, ainda permanecem em aberto. TcKAP7 influenciou nas repostas ao estresse oxidativo, de radiação UV e cisplatina, três tipos de danos caracteristicamente bem distintos um do outro e que ativam vias metabólicas bem distintas. Apesar de ser didática, o estudo do metabolismo em vias separadas não reflete a realidade celular. O contexto no qual aquele dano ocorre é de vital importância na resposta. Entretanto, esta influência em vias que lidam com danos tão distintos entre si sugere que talvez o reparo mitocondrial não conte com vias canônicas como no núcleo.

De fato, proteínas do NER já foram descritas também como possuindo localização mitocondrial, muitas vezes em funções não canônicas em células de diversos outros organismos (STEVNSNER *et al.*, 2002). A proteína XPD foi identificada interagindo e localizada nas mitocôndrias em linhagens de células de osteosarcoma e de rim (LIU, JING *et al.*, 2015). As proteínas CSA e CSB também já foram descritas em interações que se iniciam após geração de danos ao DNA mitocondrial (KAMENISCH *et al.*, 2010). Porém, estes artigos descrevem funções não-canônicas destas proteínas.

No caso de XPD foi demonstrado que o silenciamento da proteína causa uma elevação nos níveis de ROS na mitocôndria, ao mesmo tempo que condições de estresse oxidativo, em células selvagem, levam a um aumento nos níveis de expressão da mesma. Também foi visto, a partir de um protocolo de qPCR semelhante ao utilizado em nossos experimentos, mas de forma qualitativa, que a presença de XPD está diretamente ligada com o reparo do DNA mitocondrial e com o surgimento da deleção comum, um fenótipo bem caracterizado de problemas no metabolismo mitocondrial. Apesar de não ser descrito o mecanismo pelo qual o gene XPD age

neste reparo, foi descoberto que seu domínio de helicase é essencial (LIU, JING *et al.*, 2015). Estes resultados demonstram claramente como uma proteína do NER é importante em uma possível função não canônica no reparo mitocondrial. Em nossos experimentos vimos que alterações nos níveis de TcKAP7 também levam a diferenças na resposta ao estresse oxidativo e na sobrevivência após exposição à radiação UV e cisplatina. Apesar de serem fenótipos distintos, já que o silenciamento de XPD leva à uma sensibilidade ao estresse oxidativo, mas o nocaute de TcKAP7 leva à uma resistência ao mesmo tipo de estresse, nossos experimentos podem estar demonstrando que TcKAP7 pode atuar de formas diversa e dependente do tipo de dano em mais de um tipo de resposta ao dano de DNA.

Além disso, ainda não se tornou claro como ocorre a translocação destas proteínas para o cinetoplasto de *T. cruzi*. Proteínas como TcRad51, TcCSB, TcOGG1, TcMYH, TcKAP7, TcPolk, TcPol β , Tc β -PAK, dentre outras, são localizadas de forma tanto ubíqua como exclusiva na organela, porém nem todas contam com predição positiva por softwares de análise, ou estruturas e sequências evidentes que direcionam estas proteínas. Também não temos evidências se as vias de reparo mitocondriais seriam canônicas ou não, apesar de experimentos sugerirem que existam proteínas de vias distintas relacionadas com determinados danos ao kDNA. Investigar se o nocaute desta proteína pode afetar o processo de infecção ou de desenvolvimento da doença de Chagas pode demonstrar se o metabolismo do kDNA seria ou não um alvo viável para desenvolvimento de drogas.

Vale a pena ressaltar também que a estrutura única do kDNA pode ter reflexos na ativação de vias reparo. A estrutura do kDNA arranjada em maxicírculos concatenados tem reflexo direto no seu mecanismo de replicação (JENSEN; ENGLUND, 2012). Além da descrição da translocação e localização de diversas proteínas de reparo nos sítios antipodais do cinetoplasto dos parasitos, não é compreendido ainda como ocorre o reparo de DNA na organela do parasito. É interessante também investigar a influência de vias de reciclagem de organelas frente a danos causados na mitocôndria. Não se tem muitas informações sobre como as vias de mitofagia e autofagia podem estar relacionadas com a resposta ao dano de DNA.

Por fim, em nosso trabalho temos a sugestão de que TcKAP7 esteja atuando em alguma via relacionada à transcrição mitocondrial (reforçado, como dito

anteriormente, pela sua homologia com TFAM e fenótipos relacionados à danos que já foram associados à problemas de transcrição, como a radiação UV). Apesar de não conseguirmos determinar uma função direta no reparo mitocondrial exercido por esta proteína, os experimentos sugerem uma ação de Kap7 na resposta ao dano ao DNA em vias relacionadas o cinetoplasto destes organismos. Uma possibilidade é a de que Kap7 esteja atuando na retomada da transcrição após o dano ao DNA e seu reparo. Seja atuando na desmontagem da maquinaria de reparo, ou na restauração da transcrição no kDNA, nossos experimentos sugerem que a proteína não está relacionada com o reparo direto destes danos (visto que mesmo o duplo nocaute é capaz de reparar seu DNA após os tratamentos, ainda que com atraso), mas apresentam morte imediata mais rápida (associada com problemas de transcrição) e problemas de replicação (que em tripanossomatídeos podem também estar relacionados com transcrição). Determinar se outras células mutantes para genes já envolvidos neste tipo de metabolismo no núcleo, como os mutantes para a proteína TcCSB e investigar os níveis de transcritos mitocondriais, bem como o número de cópias do kDNA após tratamento com agentes genotóxicos podem elucidar o papel de TcKAP7 no metabolismo de danos do kDNA.

6. Conclusões

Neste trabalho pudemos verificar que *T. cruzi* é capaz de lidar com danos oxidativos em seu kDNA. Fomos capazes de descrever uma DNA glicosilase que é capaz de atuar no metabolismo do kDNA. TcMYH está envolvida com o metabolismo de 8-oxoguanina e com a geração de sítios AP em *T. cruzi*, visto que sua superexpressão aumentou tanto a velocidade da geração destes sítios quanto o nível de sítios em seu DNA total. Também demonstramos que TcMYH está envolvida com o metabolismo de DNA após estresse oxidativo tanto na mitocôndria quanto no núcleo de *T. cruzi*. Este fato demonstra que o parasito possui diversas proteínas capazes de lidar com esta modificação em seu cinetoplasto.

Em nossos estudos com proteínas associadas ao cinetoplasto fomos capazes de identificar uma proteína envolvida com o metabolismo de DNA após tratamento com agentes genotóxicos. Demonstramos que a falta de TcKAP7 é capaz de aumentar a sensibilidade à agentes genotóxicos muito envolvidos com problemas de transcrição, como a radiação ultravioleta e a cisplatina. Este fato foi visto também em outro tripanossomatídeo, o organismo *Angomonas deanei*. Em ambos os organismos a ausência de KAP7, no caso de *T. cruzi*, e a diminuição nos níveis de KAP7, no caso de *A. deanei*, levou a um aumento na sensibilidade a longo prazo após tratamentos com cisplatina e radiação UV, indicando uma via de resposta associada com a transcrição no kDNA destes parasitos.

Também pudemos demonstrar que a via de morte para o qual o parasita se encaminha parece ser dependente tanto do local do dano (núcleo ou mitocôndria) quanto do tipo de dano causado. A morte causada por UV é distinta entre as células selvagens e as células mutantes para TcKAP7, assim como é distinta da morte causada por cisplatina. Verificamos que *T. cruzi* possui vias de reparo no kDNA, mas que possivelmente estas vias podem ter passos distintos das vias nucleares. Estes resultados demonstram que o parasito possui mecanismos de metabolismo de DNA mitocondrial que podem ser únicos, visto que células humanas não são capazes de reparar danos causados por cisplatina e radiação UV.

Capítulo 2

Troca de material genético e recombinação

1. Introdução

1.1. Variabilidade genética de *Trypanosoma cruzi*

Apesar de constituir um grupo monofilético, estudos demonstram que a estrutura populacional de *T. cruzi* é complexa e uma das questões ainda em aberto sobre esta organização das populações diz respeito justamente à relação entre as cepas já identificadas e as distintas manifestações clínicas da doença de Chagas (ANDRADE *et al.*, 2002; PRATA, 2001; ZINGALES, B. *et al.*, 2009; ZINGALES, BIANCA *et al.*, 2012). Já foi descrito que estas diferenças estão relacionadas tanto com as características do próprio parasito, como também de seu hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2002). Estudos de infecção com diferentes misturas de linhagens do parasito também demonstraram diferença no tropismo entre representantes de cepas distintas. Esta diferença estaria relacionada não somente com a capacidade de infecção, mas também com a replicação intracelular diferencial entre cada cepa do parasito (ANDRADE *et al.*, 2010).

O avanço dos estudos de filogenia das populações de *T. cruzi* levou à criação das unidades taxonômicas discretas (DTU), que foram definidas como grupos geneticamente relacionados que podem ser identificados por marcadores moleculares comuns (TIBAYRENC, MICHEL, 1998). O uso de novas técnicas de biologia molecular propôs uma nova classificação das DTUs do parasito, dividindo as duas anteriormente existentes em seis, denominadas DTUs I, IIa, IIb, IIc, IId e IIe. Nesta classificação, a DTU *T. cruzi* I continuou como sendo uma DTU única, ao passo que a DTU *T. cruzi* II foi subdividida e passou a englobar cepas que não haviam sido classificadas anteriormente (BRISSE; BARNABÉ; TIBAYRENC, 2000). Novos estudos, desta vez utilizando sequências do gene mini-éxon, demonstraram a presença de um terceiro grupo que havia sido incluída como sendo da DTU IIc. Estes estudos levaram à caracterização de uma terceira linhagem ancestral distinta de *T. cruzi*, denominada *T. cruzi* III (BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000). Estas evidências aumentaram a complexidade das relações filogenéticas entre as cepas em estudo e isto levou à uma nova classificação, na qual foi sugerida a existência de seis DTUs, nomeadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES, B. *et al.*, 2009). Esta nova divisão foi corroborada por outros estudos que demonstraram a distribuição geográfica e a associação de aspectos comuns entre as DTUs e seu ciclo de transmissão

(ZINGALES, BIANCA *et al.*, 2012). Atualmente, como mostrando na Figura 1, é proposto a existência de três linhagens não-híbridas, as DTU's TcI, TcII e TcIII (em azul na figura), e duas cepas surgidas de um evento de hibridização natural que teriam originado as cepas das DTU's TcV e TcVI (em vermelho na figura). Estudos com o fator de virulência trans-sialidase sugerem que as DTUs TcIII e TcIV seriam derivadas da DTU TcI (BURGOS *et al.*, 2013), porém a exata posição da DTU TcIV neste contexto evolutivo ainda não é clara.

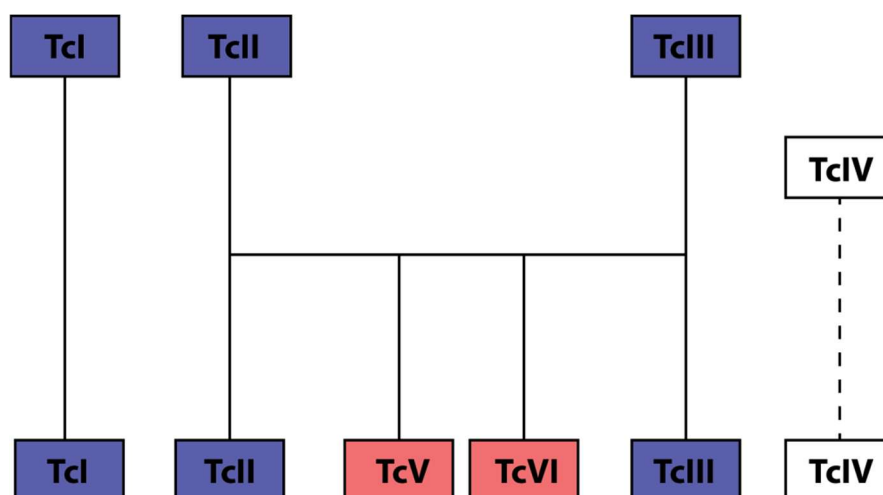


Figura 1 - Relações filogenéticas entre as linhagens de *Trypanosoma cruzi* – Atualmente é proposto que as DTUs TcI, TcII e TcIII seriam ancestrais, e um evento de hibridização entre TcII e TcIII teria originado as cepas das DTUs TcV e TcVI. A relação filogenética da DTU TcIV não é bem estabelecida, porém existem indícios de sua maior proximidade com TcI. Vermelho: DTU's híbridas; Azul: DTU's não-híbridas

A dificuldade em se conseguir elucidar estas relações filogenéticas poderia estar relacionada com a forma de reprodução do parasito e com possíveis eventos de troca genética entre as linhagens. Em *Trypanosoma cruzi* é proposto uma estrutura predominantemente clonal para as populações, com raríssimos eventos de recombinação. Análises sobre o número de genótipos observados nas populações de *T. cruzi* demonstraram um desequilíbrio de ligação entre os marcadores genéticos usados, levando à esta proposição (TIBAYRENC, MICHEL; AYALA, 2002). Existem, porém, cepas híbridas em populações naturais do parasito, como o clone CI Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005), e a hipótese clonal tem sido contestada por alguns autores.

1.2. Recombinação e troca genética

O papel da recombinação nos processos de troca de material genético já foi descrito para diversos organismos. Abordagens *in silico*, por exemplo, já demonstraram vários possíveis mecanismos de geração de variabilidade em famílias multigênicas distintas. Em simulações foi visto que a geração de mutações causa um aumento da divergência entre regiões duplicadas destas famílias. Estas simulações demonstraram que a recombinação e o surgimento de mutações de ponto afetam de forma diferente a geração de variabilidade, mas que estes processos podem estar relacionados com a evolução e filogenia em *T. cruzi* (AZUAJE; RAMIREZ; DA SILVEIRA, 2007). Porém, troca genética e recombinação podem ter vários sentidos dependendo do contexto no qual são utilizados. Neste trabalho, troca genética é considerada qualquer troca de material genético que ocorra sem a necessidade de produção de gametas e envolvimento obrigatório do processo meiótico.

Como já dito anteriormente, é relatado na literatura a presença de troca genética em tripanossomatídeos. Em *T. brucei* a frequência de resultados variantes em eletroforese após uso de enzimas de restrição foi descrita desde a década de 1980 e era um indicativo de que mecanismos de troca genética poderiam existir no parasito (GIBSON, W. C.; DE; GODFREY, 1980). Em 1986, Jenni e colaboradores descreveram a primeira evidência direta de que um ciclo sexual poderia ocorrer em tripanossomatídeos. Neste trabalho, os autores utilizaram cinco marcadores genéticos diferentes e, após a passagem no hospedeiro invertebrado, foram capazes de demonstrar a existência de troca genética entre as linhagens parentais. Os clones resultantes do experimento eram híbridos ou heterozigotos para os marcadores testados, enquanto as linhagens parentais eram homozigotas nestes marcadores (JENNI *et al.*, 1986). Estes dados, juntamente com dados sobre a dinâmica de populações de *T. brucei* foram as primeiras sugestões de que a fissão binária e expansão clonal poderia não ser a única maneira de reprodução em tripanossomatídeos (DUFFY *et al.*, 2013; TETLEY *et al.*, 1987).

Diversos estudos já tentaram evidenciar os mecanismos de reprodução de *T. cruzi*. Algumas revisões e estudos já analisaram qual o efeito da reprodução clonal em organismos patogênicos (TIBAYRENC, M.; AYALA, 2012; TIBAYRENC, MICHEL; AYALA, 2002, 2015a) porém, estes estudos não analisam a medida correta que o processo de recombinação possa ocorrer em *T. cruzi*. Análises baseadas em estudo

do desequilíbrio de ligação e desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg que era esperado levam à sugestão de que o modelo de reprodução é predominantemente clonal com raros casos de troca genética ocorrendo (BAPTISTA *et al.*, 2014; BRISSE *et al.*, 2003; MESSENGER; MILES, 2015).

Um dos principais trabalhos a questionar a hipótese de reprodução clonal exclusiva em *T. cruzi* foi realizado em 2003, quando Gaunt e colaboradores mostraram um evento de troca de material genético entre isolados de *Trypanosoma cruzi*. Utilizando-se dos marcadores de resistência neomicina e higromicina, este trabalho demonstrou que populações distintas de *T. cruzi*, da DTU Tc1, eram capazes de realizar troca genética entre elas. Neste trabalho foi visto que, após infectarem células epiteliais de rim de macaco verde, populações parentais que carregavam cada uma apenas um dos marcadores de resistência, deram origem a populações híbridas. Estas populações eram resistentes a seleção dupla com os antibióticos e foi detectado, a partir de reações de PCR, a presença dos dois marcadores genéticos. Esta foi, durante muito tempo, a única descrição de troca de material genético entre populações distintas de *T. cruzi* em condições laboratoriais. Este trabalho demonstra que *T. cruzi* é capaz de realizar trocas genéticas e poderia corroborar com a ocorrência de eventos de recombinação em ambiente natural (GAUNT *et al.*, 2003).

De fato, outros estudos também corroboram a ocorrência de eventos de recombinação genética. A análise da frequência alélica e haplotípica em diferentes populações isoladas de *T. cruzi* no estado de Minas Gerais demonstraram que a frequência de troca genética pode ser maior que a esperada (BAPTISTA *et al.*, 2014). Além disso, investigações utilizando 49 microssatélites demonstraram um nível de heterozigosidade nestes microssatélites que não é compatível com uma reprodução sem eventos significativos de recombinação (LLEWELLYN; MILES; *et al.*, 2009). Também foi visto que cepas isoladas no Equador apresentam um nível de desequilíbrio de ligação mais alto que o esperado para *loci* fisicamente ligados (OCANA-MAYORGA *et al.*, 2010; SCHWABL *et al.*, 2018). Não foi descrito, porém, se os mecanismos desta troca genética já descrita seriam os mesmos dos observados para outros tripanossomatídeos como *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*, no qual há a proposição de mecanismos meióticos envolvidos neste processo (AKOPYANTS *et al.*, 2009; PEACOCK *et al.*, 2014).

Recentemente um estudo analisou 45 clones de uma região endêmica do Equador e demonstrou que a reprodução sexual pode ser um mecanismo relevante para a filogenia de *T. cruzi*. A partir da análise de 45 genomas de diversos isolados de uma região ao sul do Equador, os autores encontraram uma frequência de meiose que é maior que uma a cada 1000 eventos de reprodução e que os níveis de homoziguidade encontrados indicam uma estrutura reprodutiva complexa. Segundo os autores, esta estrutura reprodutiva levaria em conta fenômenos de fusão genômica e possivelmente mecanismos parassexuais também teriam influência neste processo (SCHWABL *et al.*, 2018).

Todos estes achados sugerem então que o processo de reprodução clonal de *T. cruzi* não é capaz de explicar a história evolutiva deste parasito. A importância dos processos de troca de material genético, ganha ou perda cromossômica e da recombinação durante a geração de novas linhagens ainda não é compreendida. Visando entender este processo, neste trabalho investigamos as diferenças no processo de hibridização e troca genética entre cepas de DTU's distintas de *T. cruzi*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Investigar a formação de híbridos entre cepas distintas de *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar os níveis de TcRad51 em cepas de diferentes DTU's de *T. cruzi*
- Analisar os níveis de formação de híbrido nestas diferentes DTU's de *T. cruzi* a partir do ensaio de análise de troca de DNA por análogos de timidina (ADexTA, do inglês *Analysis of DNA Exchange by Thymidine Analogs*)
- Analisar os níveis de formação de híbridos em misturas de cepas distintas de diferentes DTU's de *T. cruzi*
- Analisar a cinética de formação de híbridos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo de células

As culturas foram mantidas à 28°C por passagem regulares em meio LIT (0,5% de liver digested neutralized, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% de KCL, 0,8% de Na₂HPO₄, 20 µg.mL⁻¹, pH 7,4), esterilizado por autoclavação e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ao meio também foram acrescentados penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg.mL⁻¹) e os respectivos antibióticos de seleção.

3.2. Incorporação de nucleotídeos

A incorporação de nucleotídeos foi feita a partir do ensaio de Análise de Troca de Material Genético a partir da incorporação de análogos de timidina (ADEXTA) como descrito por Da Silva, e colaboradores (DA SILVA, MARCELO *et al.*, 2018). Nesta análise cada um dos análogos em questão, CldU (5'-cloro-2'-desoxiuridina) e IdU (5'-iodo-2'-desouridina), foram acrescentados a uma concentração de 100µM cada, de forma separada, a duas populações distintas de *T. cruzi* em frascos de cultura separadas. Cada um destes frascos continha inicialmente 5mL de cultura à uma concentração de 5x10⁶ células/ml. Após 12 horas do início da incorporação, as células foram então lavadas três vezes com PBS 1x estéril à temperatura ambiente para retirada de qualquer análogo não incorporado do meio. As células foram então ressuspensas em mesmo volume de meio LIT suplementado com soro fetal bovino 10%. Estas duas alíquotas de células, uma com o análogo CldU e a outra com o análogo IdU, foram então misturadas e incubadas à 28°C por 24 horas ou 48 horas, dependendo do tipo de análise que deveria ser feita, para permitir a troca genética. No caso dos ensaios de cinética de incorporação, alíquotas de 1mL foram fixadas nos tempos desejados. Os tempos se referem ao tempo após a mistura das duas alíquotas.

3.3. Imunofluorescência

Após a incorporação as células foram fixadas nos pontos de tempo desejados. No mínimo 1mL de cada mistura foi fixado em PFA 4% por 7 minutos a cada ponto de tempo a ser analisado. As células foram então depositadas em uma lâmina de 8 poços (Tekdom), previamente coberta com Poly-L-lisina (Sigma Aldrich) e deixadas 10

minutos para aderir à lâmina. Após isto as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS 1X por 10 minutos à temperatura ambiente. Estes parasitos foram então lavados três vezes com PBS 1X à temperatura ambiente e tratadas com HCl 2M durante 20 minutos à temperatura ambiente, para permitir que os anticorpos primários tenham acesso ao análogo incorporado no DNA das células. Após isso, as células foram lavadas com PBS 1X três vezes e tratadas com Borate Buffer (100mM de ácido bórico, 75mM de NaCl e 25mM de tetraborato de sódio, pH 8) por 20 minutos para neutralização do HCl restante. Logo após, as células foram de novo lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo monoclonal primário anti-CldU (Accurate, catálogo: YSRMCA2060GA) e com o anticorpo monoclonal primário anti-IdU (BD Biosciences, catálogo: 347580), ambos na diluição de 1:300 em solução de bloqueio contendo BSA 4%. Após isto as lâminas foram então lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-mouse Alexa-Fluor 568 (Thermo Scientific, catálogo: A-21124) e com o anticorpo secundário anti-rat Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, catálogo: A-11006), ambos diluídos 1:600 em solução de bloqueio contendo BSA 4%. Os poços foram em seguida lavados três vezes com PBS 1x e as lâminas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD, contendo DAPI a 1,5 µg.ml⁻¹ (Vector Laboratories). Na sequência, as lâminas foram examinadas e as imagens capturadas, utilizando-se um microscópio de fluorescência ApoTome.2 (Zeiss) e estas foram analisadas utilizando o software ZenBlue 2.5 (Zeiss Software). As imagens também foram analisadas utilizando o microscópio de fluorescência Olympus BX51 com a câmera Olympus XM10 e estas imagens foram montadas e analisadas utilizando o software CellF (versão 5.1.2640). Todos estes experimentos foram feitos em triplicata biológica,

3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para determinar os níveis de transcrição dos genes Rad51 diferentes cepas utilizadas no trabalho foi realizada PCR quantitativa em tempo real. 10mL de cultura à 1x10⁷ células/ml foram centrifugadas a 4000 rpm, por 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 1mL de TRIzol e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após o processo de lise pelo TRIzol, 200 µL de clorofórmio foram adicionados e misturado por inversão e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados à 11.000 rpm, por 15 minutos, à 4°C, para a

separação de fases. Após isto, a fase incolor, contendo o RNA, foi coletada e o restante descartado. Esta fase incolor foi incubada com isopropanol e incubada por uma hora à -20°C.

Após isso, esta fase incolor foi centrifugada à 11.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante descartado. O pellet de RNA foi então lavado duas vezes com 1mL de etanol 75% (7500rpm, 5 minutos, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado para secar à 37°C, para retirar o excesso de etanol residual. O RNA foi, por fim, ressuspendido em 60µL de H₂O MiliQ e dosado. A integridade da amostra foi verificada a partir de corrida em gel de agarose desnaturante 1%, contendo formaldeído.

Após a verificação da integridade do RNA, cada amostra de RNA foi tratada com DNase para remoção de contaminação por DNA genômico. As amostras de RNA extraídas foram quantificadas no aparelho NanoDrop ND-100 UV/Vis (NanoDrop Technologies, USA) e 10µg totais de cada amostra foram tratadas de acordo com as recomendações do fabricante do kit DNA-free DNA removal (Ambion, catálogo: AM1906). As amostras foram posteriormente submetidas à reações de PCR e corrida em gel de agarose 1% para confirmar a eficácia do tratamento e eliminação de DNA genômico. Por fim, as reações para a síntese de cDNA foram realizadas utilizando-se 1µg das amostras de RNA tratados com DNase e sem contaminação com DNA genômico detectável, com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, catálogo: 4368814) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5. PCR em Tempo Real

As reações de PCR quantitativa em Tempo Real foram feitas utilizando-se o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (ThermoFisher Scientific, catálogo: 4367659) como sistema de detecção de acordo com as recomendações do fabricante. As eficiências de cada primer foram testadas a partir da diluição seriada do cDNA obtido das cepas não irradiadas e foram consideradas eficiências entre 90% e 110%. Os resultados foram obtidos em placas de 384 poços no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todas reações foram feitas em triplicata, utilizando-se 5ng de cDNA, 300nM de cada iniciador, 5µL de Mix SYBR 2X e água DNase RNase free para completar o volume de 10µL para cada reação. As reações foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade e Ecologia Molecular –

LBEM/UFMG. O seguinte programa foi utilizado nas reações: um passo inicial de 50°C por 2 minutos, um passo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Os níveis de transcrição foram obtidos a partir da comparação das cepas em questão com a cepa CI Brener (já utilizada em outros estudos). 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. Os resultados foram normalizados utilizando-se GAPDH como gene constitutivo. Os resultados de transcrição relativa foram obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os iniciadores para a PCR em tempo real foram obtidos de trabalhos anteriores para o gene Rad51 (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006) e para o gene GAPDH (ARAÚJO *et al.*, 2011). A sequência está apresentada na tabela 2.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a PCR em Tempo Real

Iniciador	Sequência
RTTcRad51Fw	5' – GGC TGT CAA GGG TAT CAG TG – 3'
RTTcRad51Rev	5' – AAC CAC TGC GGA TGT AA GC – 3'
RTGAPDH2Fw	5'-CGGTGGACGGTGTGTCCGGTG-3'
RTGAPDH2Rev	5'-CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG-3'

4. Resultados

4.1. Crescimento após incorporação de análogos de timidina

Nosso ensaio de detecção de formação de híbridos em *T. cruzi* utiliza-se da incorporação de análogos de timidina tanto no DNA nuclear quanto no kDNA de parasitos em cultivo. É descrito, porém, que o uso destes análogos em determinadas concentrações e em conjunto com outras drogas possuem propriedades tóxicas para neurônios e outros tipos celulares (DAVIDSON; KAUFMAN, 1979; HANCOCK *et al.*, 2009). Apesar da utilização de incorporação de análogos de timidina ser utilizada em experimentos como a análise de replicação de DNA de fita simples em tripanossomatídeos (CALDERANO *et al.*, 2015) nosso primeiro passo foi verificar se as concentrações utilizadas em nossa incorporação são capazes de causar problemas de replicação em *T. cruzi*. Para tanto, foi feita uma curva de crescimento com 100 μ M e 300 μ M de cada análogo utilizando-se a cepa CL Brener.

Como mostrado na figura 2, o crescimento do parasito não foi afetado em nenhuma das doses testadas para nenhum dos análogos utilizados. Este resultado demonstra que a incorporação de análogos de timidina não é capaz de causar problemas de replicação em formas epimastigotas em doses de até 300 μ M, permitindo a utilização do ensaio em *T. cruzi*.

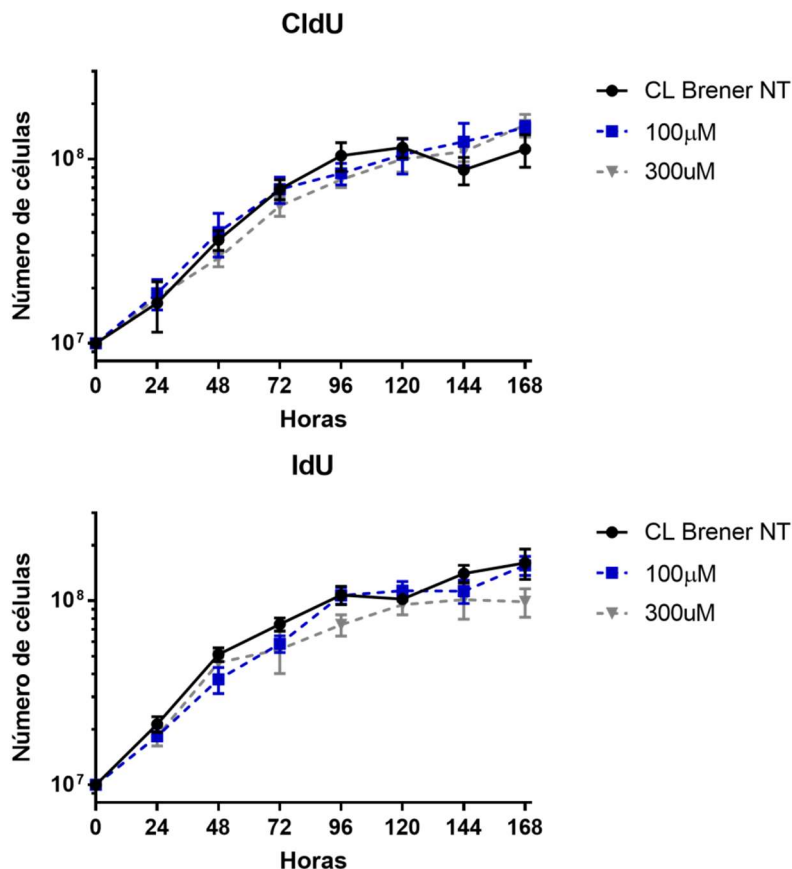


Figura 2 – Curva de crescimento após incorporação de análogos – A)

Gráfico do crescimento da cepa CL Brener após incorporação do análogo de timidina CldU em duas concentrações distintas: 100µM e 300µM **B)** Gráfico do crescimento da cepa CL Brener após incorporação do análogo de timidina IdU em duas concentrações distintas: 100µM e 300µM. Nenhum dos dois análogos foi capaz de alterar de forma significativa o crescimento das células nas concentrações utilizadas.

4.2. Cinética de formação de híbridos após incorporação de análogos de timidina

Visto que a incorporação de nucleotídeos não é capaz de causar problemas no crescimento das células de *T. cruzi*, nós utilizamos então a incorporação de análogos de timidina como explicado nos materiais e métodos. Brevemente, duas populações distintas da cepa CL Brener foram deixadas incorporando durante 12 horas cada dum dos análogos de forma separada, a partir da adição do mesmo no meio líquido. Em uma população foi incorporado o análogo CldU (5'-cloro-2'-desoxiuridina) e em outra o análogo IdU (5'-iodo-2-

desouridina). Após estas 12 horas as células foram então centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS1x afim de se retirar o excesso de análogos que poderiam não ter sido incorporados e estarem em suspensão no meio, e então as células foram ressuspensas em meio LIT suplementado com soro fetal bovino. Então estas duas populações foram misturadas e deixadas em crescimento por 24 horas para a detecção do processo de hibridização.

Como descrito anteriormente, a detecção do evento de hibridização é feita a partir de anticorpos específicos para cada um dos análogos, e subsequente detecção por anticorpos secundários com fluorescência distinta. A captura de imagens foi feita a partir da emissão de fluorescência de cada marcador utilizado e visto no microscópio: azul para DAPI, verde para o anticorpo que reconhece o análogo CldU e vermelho para o anticorpo que reconhece o análogo IdU. Quando a sobreposição destes campos é feita a hibridização é detectada como a marcação amarela que pode surgir tanto no núcleo quanto no cinetoplasto do parasito.

Exemplos de resultados observados pelo experimento podem ser vistos na figura 3A e no Anexo 3. Como demonstrado na figura, o nível de hibridização em cada parasito é bem distinto, atingindo o que visualmente parece ser tanto quase a totalidade do DNA nuclear ou do cinetoplasto, quanto apenas pequenas porções do DNA do parasito. Importante notar também que tanto o DNA do cinetoplasto, quanto o DNA nuclear são alvos do processo de troca de material genético e que existe também uma grande número de células que apresentam marcação para apenas um dos análogos.

Nosso primeiro passo foi então investigar a cinética de formação destes híbridos nas primeiras 24 horas após a mistura das duas populações. Alíquotas foram então retiradas a cada 2 horas, até o tempo de 8 horas e também após 24 horas depois do início da mistura. Como visto na Figura 3B, após a mistura das populações, é visto que a hibridização começa a ser detectável em tempos tão curtos quanto 4 horas após o início da mistura, onde foi detectado cerca de 2,01% de híbridos. Este valor cresce então até alcançar um valor 3 vezes maior no ponto de 24 horas (cerca de 6,28%). Este resultado demonstra que a

hibridização é um evento que ocorre na população de forma crescente e que o observado não é um artefato da técnica.

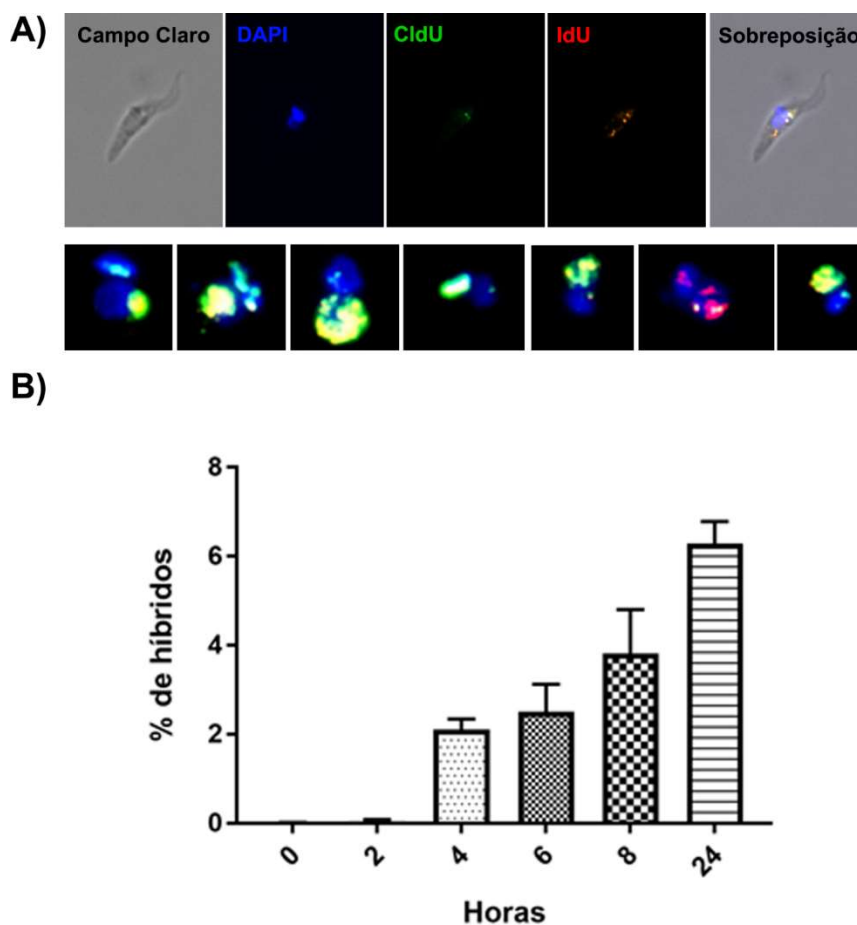


Figura 3 - Cinética de hibridização nas primeiras 24 horas após incorporação de análogos de timidina – A) No painel superior uma imagem de demonstração da sobreposição feita e da imagem adquirida para cada painel de fluorescência. No painel inferior imagem de exemplos de parasitos considerados como híbridos após o ensaio de ADEXTA. **B)** Quantificação da porcentagem de células híbridas observadas no microscópio de fluorescências nas primeiras 24 horas após início do experimento.

Nosso próximo passo foi verificar se, após um ciclo do parasito, os níveis de hibridização se alterariam. Para investigar isso o mesmo desenho experimental foi repetido e, desta vez, as células da cepa CL Brener foram acompanhadas e fixadas nos pontos de 24 horas e 48 horas após a mistura de células previamente incorporadas com os análogos. Assim como descrito anteriormente (ALVES *et al.*, 2018) foi observado que a eficiência de incorporação dos nucleotídeos modificados é de cerca de 30% para ambos análogos de timidina (Figura 4). Também foi visto que o nível de híbridos

detectados pelo ensaio não se altera de forma significativa entre 24 horas e 48 horas após a mistura das duas populações. O valor encontrado após 24 horas foi de 6,23% de células híbridas, enquanto o valor encontrado após 48 horas foi de 5,51% de células híbridas. Esta diferença, não significativa, demonstra que os níveis de híbridos detectados pelo ensaio são similares tanto no primeiro ciclo de replicação, quanto no segundo.

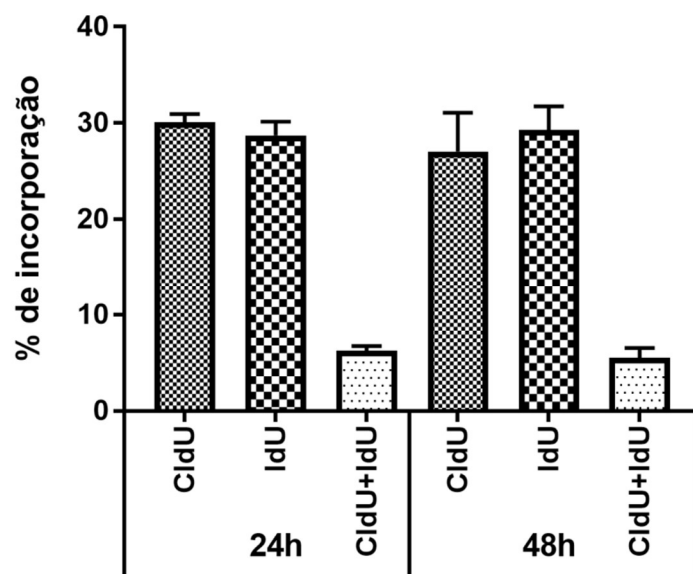


Figura 4 - Cinética de hibridização 48 horas após incorporação de análogos de timidina – Quantificação da porcentagem de híbridos e de incorporação de cada análogo em função da população total observada em microscopia de fluorescências após 24 horas e 48 horas do início do experimento. Não existe diferença na porcentagem de híbridos entre os dois tempos analisados.

Um importante ponto de validação da técnica é se a sobreposição vista realmente corresponde a um evento de hibridização ou se é um artefato observado pela microscopia. Como prova de conceito de que o evento visto é devido realmente à hibridização foi feita uma imagem contendo as camadas do eixo Z para um parasito que apresentou o fenótipo de troca de material genético. Como visto na Figura 5, a fluorescência sobreposta vista como amarelo é encontrada em todas as camadas da imagem, demonstrando que o observado é um evento de troca genética em *T. cruzi*. Juntos, todos estes resultados comprovam que o ensaio é uma forma viável de se analisar os eventos de troca

de material genético e que estes eventos ocorrem principalmente nas primeiras 24 horas após o ensaio.

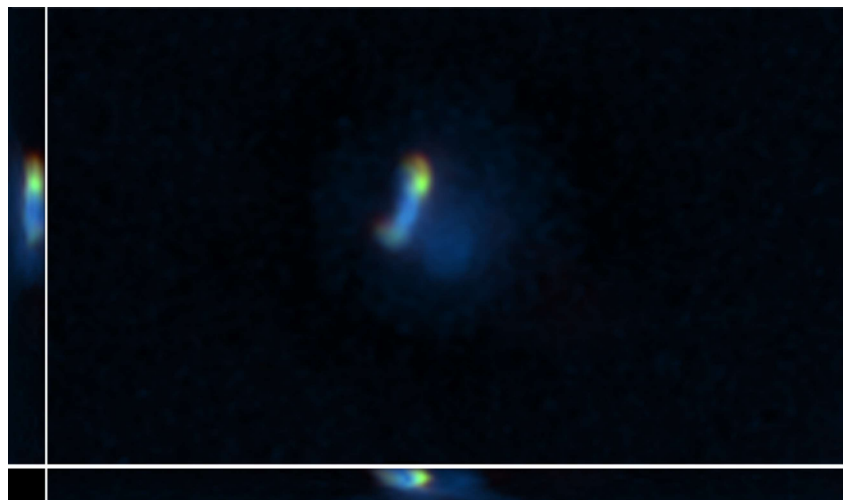


Figura 5 - Deconvolução do eixo Z de uma célula híbrida – Deconvolução de um parasito que apresentou o evento de hibridização em seu cinetoplasto. A imagem demonstra que a detecção da fluorescência que corresponde ao evento de troca genética não é devido à sobreposição de duas fluorescências em planos distintos.

4.3. Porcentagem de hibridização de cepas híbridas e não-híbridas

Após verificarmos a viabilidade do ensaio de análise de troca de material genético pela incorporação de análogos de timidina, nosso próximo passo foi verificar se havia diferença no nível de hibridização em populações de cepas distintas de *T. cruzi*. Para investigar isso, realizamos a incorporação e a mistura de células das cepas CL Brener, Dm28c, Bug2149 cl 10, Sylvio e Y. Após a mistura, as células foram fixadas e os níveis de hibridização foram medidos como já explicado anteriormente. Novamente, todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica e um mínimo de 300 células por mistura foi contado.

A figura 6 demonstra os resultados obtidos nesta análise. Como demonstrado na figura, as duas cepas com níveis maiores de hibridização são as cepas CL Brener, com aproximadamente 6,28% de híbridos, e a cepa Bug2149 cl 10, com aproximadamente 7,58% de células híbridas. Estas duas cepas são representantes das DTU's híbridas TcVI e TcIV, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatística entre as duas cepas. Na análise das cepas

não híbridas foi visto que as cepas Dm28c (DTU TcI), com aproximadamente 2,63% de células híbridas e Y (DTU TcII), com aproximadamente 1,73% de células híbridas, possuem níveis significativamente menores que ambas cepas das DTU's híbridas. Surpreendentemente na análise da cepa Sylvio, também representante da DTU não híbrida TcI, foi visto que os níveis de hibridização foram mais altos que os esperados, chegando a aproximadamente 5,56% de células híbridas. Estes resultados demonstram que cepas distintas de *T. cruzi* possuem níveis distintos de troca genética e que cepas não híbridas tendem a ter níveis menores de troca de material genético que cepas híbridas.

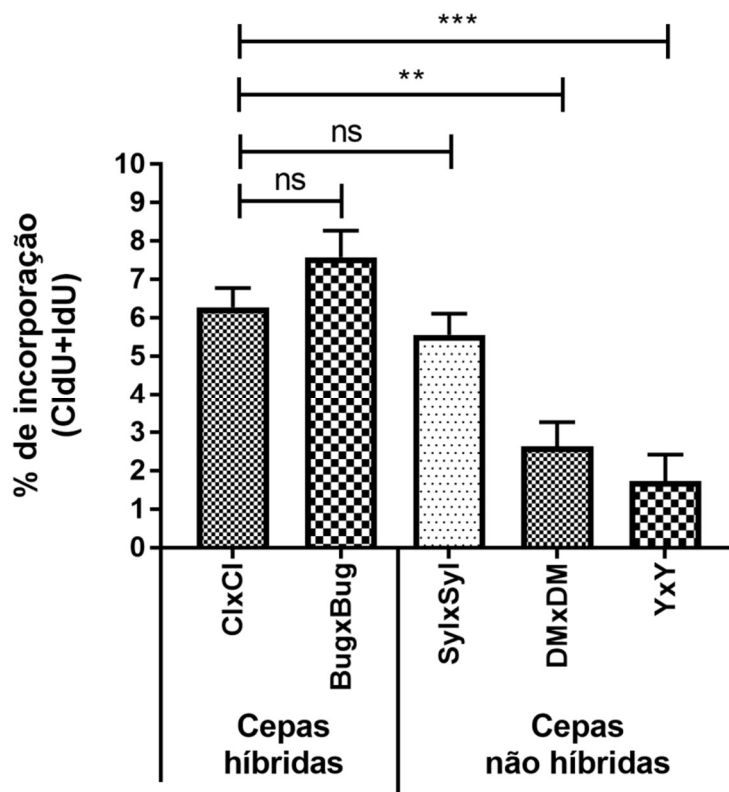


Figura 6 - Níveis de hibridização de cepas distintas de *T. cruzi* – Quantificação da porcentagem de híbridos encontrados em cepas representantes de DTU's híbridas (Cl Brener e Bug214 cl10) e não-híbridas de *T. cruzi* (Sylvio, Dm28c e Y). Cepas de DTU's naturalmente híbridas apresentam níveis maiores de híbridos que cepas de DTU's naturalmente não híbridas. A única exceção foi a cepa Sylvio que apresentou níveis similares às das cepas Cl Brener e Bug214 cl10 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, teste t student)

4.4. Porcentagem de hibridização de misturas de células híbridas e não-híbridas

Após verificarmos que o nível de células que passaram pro troca genética é diferente em cepas de DTU's híbridas e não-híbridas, nosso próximo passo foi verificar a ocorrência destes eventos em misturas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Para tal, o mesmo protocolo foi repetido com as misturas entre CL Brener, Dm28c e Y.

Como demonstrado na Figura 7, as misturas apresentam níveis diferentes de hibridizações. Como controle foi utilizada a comparação com a cepa CL Brener e, novamente, os níveis de hibridização desta cepa ficaram ao redor de 6,11%. A mistura desta cepa com cepas de DTU's não híbridas, Dm28c e Y, apresentaram uma redução significativa neste valor. A mistura de CL Brener com Dm28c apresenta um nível de hibridização de aproximadamente 3,68% e com a cepa Y de aproximadamente 2,68%. A mistura de Dm28c com a cepa Y apresentou um valor de hibridização de aproximadamente 2,16%. Quando foi utilizada a cepa Bug2149 cl 10 foi visto que, em conjunto com a cepa CL Brener, a mistura apresentou um alto nível de hibridização, de aproximadamente 6,63%. A mistura desta cepa com Dm28c apresentou um nível de hibridização de 2,49% aproximadamente. Juntos estes resultados demonstram que as cepas são capazes de trocar material genético entre si e que, com o envolvimento de cepas não híbridas, o valor de hibridização encontrado é menor em comparação dos valores encontrados entre duas cepas híbridas.

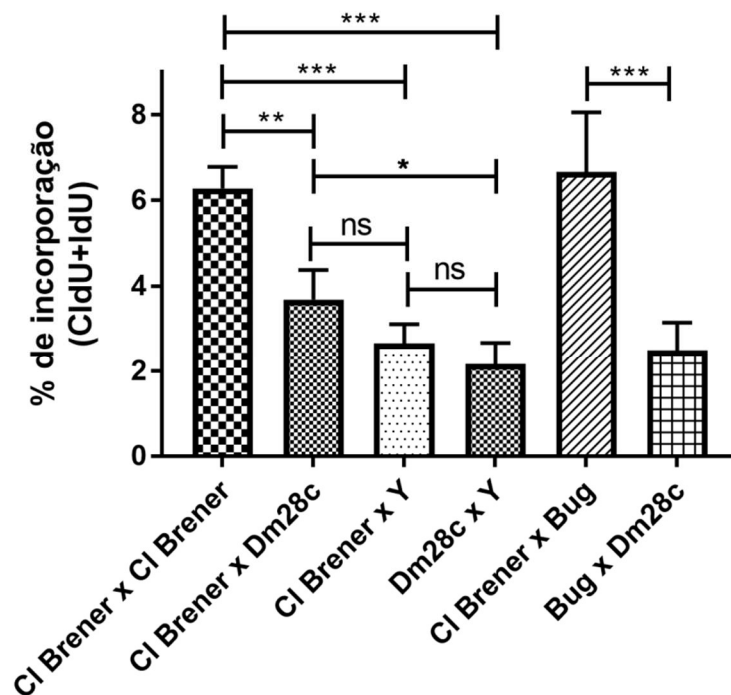


Figura 7 – Níveis de hibridização de misturas de cepas distintas – Quantificação da porcentagem de híbridos encontrados em misturas contendo cepas representantes de DTU's híbridas (CI Brener e Bug214 cl10) e não-híbridas de *T. cruzi* (Dm28c e Y). Mistura contendo apenas DTU's naturalmente híbridas (CI Brener e Bug214 cl10) apresentam altos níveis de hibridização. Misturas que apresentam alguma das cepas de DTU's naturalmente não-híbridas (Dm28c e Y) apresentam níveis de hibridização significativamente menores que os observados nas misturas de DTU's híbridas. Os valores encontrados para misturas contendo DTU's híbridas e não-híbridas são intermediários, mas menores que os feitos apenas com cepas naturalmente híbridas (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, ****p<0,0001, teste t student)

4.5. Expressão de TcRad51 em cepas híbridas e não híbridas

Uma das vias que poderiam estar relacionadas com a diferença nos níveis de troca genética entre as DTU's distintas de *T. cruzi* seria a via de recombinação homóloga. Em nosso grupo já foi caracterizado o gene TcRad51, um dos principais genes desta via, e foi demonstrado que este está diretamente envolvido com a recombinação homóloga em resposta à danos causados no

DNA (GOMES PASSOS SILVA *et al.*, 2018) e com a geração de híbridos (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018). Foi demonstrado que a cepa híbrida, CL Brener possui níveis maiores de TcRad51 que cepas não híbridas, e que o nível de troca genética é diretamente proporcional aos níveis da proteína (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018).

Como foi visto, neste trabalho, que outras cepas não-híbridas também apresentam níveis baixos de troca de material genético, nosso próximo passo então foi determinar os níveis de TcRad51 destas cepas por PCR em tempo real. A Figura 8 demonstra os resultados obtidos. Como visto na figura, os níveis de TcRad51 das cepas não-híbridas Dm28c e Y são significativamente menores que a da cepa híbrida CL Brener. Surpreendentemente os níveis da cepa Sylvio, também de uma DTU não-híbrida, não foram menores que o da cepa CL Brener. O valor encontrado para Sylvio também foi estatisticamente diferente do valor para as cepas Dm28c e Y (p-valor <0,01). Apesar disto, este resultado é concordante com o nível mais alto de híbridos que foi encontrado para esta cepa no ensaio de ADEXTA (Figura 6). Estes resultados corroboram a hipótese de que a hibridização é diretamente relacionada com os níveis de TcRad51 em cada cepa.

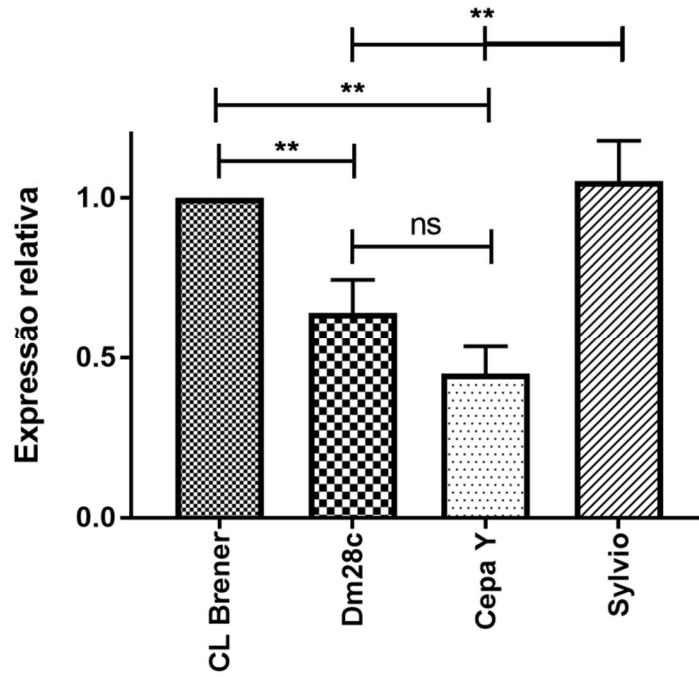


Figura 8 – Níveis de TcRad51 de cepas distintas de *T. cruzi* – Níveis de transcritos de TcRad51 em cepas naturalmente híbridas e não híbridas de TcRad51. Em comparação com CL Brener, as cepas não-híbridas Dm28c e Y apresentam níveis significativamente menores de TcRad51 que a cepa híbrida CL Brener. (** $p < 0,01$, teste t student)

5. Discussão

A reprodução clonal proposta para *T. cruzi* não é capaz de explicar diversos fenótipos observados na estrutura populacional do parasito. Apesar da descrição de eventos de troca genética, recombinação e até formação de gametas em alguns tripanossomatídeos (GAUNT *et al.*, 2003; INBAR *et al.*, 2013; JENNI *et al.*, 1986), não havia uma forma reprodutível e simples de se rastrear estes eventos em populações destes parasitos. Neste trabalho nós aplicamos a técnica de incorporação de diferentes análogos de timidina para a detecção de eventos de troca genética em *T. cruzi*. Primeiramente demonstramos que, apesar da descrição de que análogos de timidina podem ter efeitos na replicação de DNA e causar problemas de estresse replicativo em determinados tipos de células humanas (DAVIDSON; KAUFMAN, 1979; HANCOCK *et al.*, 2009), as concentrações utilizadas neste trabalho não foram capazes de causar problemas de replicação em *T. cruzi*. Desta forma, os resultados observados não são decorrentes de alteração no metabolismo do parasito em virtude da incorporação destes análogos. Nosso próximo passo foi verificar qual a cinética de detecção destes híbridos. Como visto na Figura 2, a detecção de híbridos segue uma cinética de crescimento até 8 horas após a mistura ser feita. Não existe, também, diferença entre o número de híbridos detectados após 24 horas e 48 horas. A hibridização que é detectada em nosso ensaio corresponde à eventos de troca genética e estes eventos ocorrem tanto no núcleo quanto no cinetoplasto do parasito de forma dependente não somente da expressão de TcRad51, mas também do tempo. Estes resultados permitem que o ensaio seja usado com a finalidade de se investigar eventos de recombinação em *T. cruzi*.

Apesar da proposição de reprodução predominantemente clonal, os mecanismos de reprodução de tripanossomatídeos tem sido alvo de debates e discordância (LLEWELLYN; LEWIS; *et al.*, 2009; MESSENGER; MILES, 2015; RAMÍREZ, JUAN DAVID; LLEWELLYN, 2014; TIBAYRENC, MICHEL; AYALA, 2015b). Mesmo com a descrição da existência de cepas naturalmente híbridas (BAPTISTA *et al.*, 2014; LEWIS *et al.*, 2017; MESSENGER; MILES, 2015; ZINGALES, BIANCA *et al.*, 2012) e da possibilidade de se recuperar cepas híbridas em condições laboratoriais (GAUNT *et al.*, 2003), a extensão da influência de eventos de recombinação no metabolismo de DNA e na dinâmica

populacional de *T. cruzi* ainda não é bem compreendida. Após a demonstração de Gaunt e colaboradores em 2003 da evidência de troca genética em *T. cruzi*, não foram relatados outros eventos em condições laboratoriais até o trabalho de nosso grupo em 2018 (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018).

Uma proposição mais parcimoniosa, porém, é a de que a reprodução de *T. cruzi* é, em sua maioria clonal, mas que conta com eventos raros de recombinação em larga escala, como evidenciado por evidências naturais de recombinação entre genoma de parasitos de DTU's distintas (BAPTISTA *et al.*, 2014; BRISSE *et al.*, 2003; EL-SAYED *et al.*, 2005). Alternativamente é proposto que estes eventos constituem um mecanismo parassexual de troca de material genético, i.e., um mecanismo, já descrito em fungos, no qual ocorre a troca deste material sem a formação de gametas ou estruturas sexuais (SHERWOOD; BENNETT, 2009). Neste cenário de troca de material genético sem a formação de gametas, a recombinação homóloga pode ser de fundamental importância.

A recombinação homóloga é uma via de metabolismo de DNA de suma importância para os organismos na geração de variabilidade e importante fator evolutivo (GONZÁLEZ-TORRES *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2013). Durante a recombinação homóloga uma enzima principal neste processo é a proteína Rad51, que forma um filamento nucleoprotéico com porções de DNA fita simples e é responsável por catalisar a invasão de uma dupla fita de DNA no cromossomo homólogo e iniciar a procura por homologia. É proposto que este filamento nucleoprotéico possui um sítio de afinidade para o reconhecimento de um dúplice de DNA complementar à região ligada à proteína, garantindo assim a fidelidade do processo (HEYER, WOLF-DIETRICH; EHMSSEN; LIU, 2010; HEYER, WOLF DIETRICH, 2007; LI, XUAN; HEYER, 2008; WONG *et al.*, 1997). *T. cruzi* apresenta um homólogo funcional de Rad51 envolvido com o processo de recombinação e reparo do DNA do parasito (GOMES PASSOS SILVA *et al.*, 2018).

Em nosso trabalho foi visto que cepas não híbridas naturalmente possuem níveis menores de TcRad51 que cepas híbridas e que esta diferença está relacionada com a resposta quebras de fita dupla no DNA causados por radiação ionizante (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018). Neste trabalho foi utilizado

também o ensaio de incorporação de análogos de timidina (ADexTA) e foi visto que os níveis de troca de material genético são distintos entre as diferentes cepas de *T. cruzi* de forma diretamente relacionada com os níveis de TcRad51 encontrados para cepas híbridas e não-híbridas. Por fim, também foi visto que cepas superexpressoras para TcRad51 apresentam níveis maiores de híbridos detectados pelo ensaio (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018).

Neste trabalho, nós continuamos a investigação dos eventos de troca genética em cepas distintas de *T. cruzi*. Como dito anteriormente, nosso ensaio se baseia na incorporação de análogos de timidina e a utilização de anticorpos para a detecção desta incorporação e eventos de troca genética (DA SILVA, MARCELO *et al.*, 2018). Nós vimos que cepas híbridas (neste trabalho as cepas CL Brener e Bug214 cl10) possuem níveis detectados de células com eventos de troca genética significativamente maiores que os níveis das células de cepas não-híbridas (neste trabalho as cepas Dm28C e Y). Este resultado reforça a hipótese de que os eventos de troca genética estão diretamente ligados ao gene TcRad51. Resultados concordantes com este foram observados também para a cepa Y e para o superexpressor de TcRad51 (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018) e para uma cepa mutante do gene TcXPC, cuja diminuição nos níveis desta proteína ocasionou um aumento inesperado de TcRad51 (MENDES, 2015).

Interessante ressaltar que, para *Leishmania spp.* e *T. brucei* a proposição de troca genética é completamente distinta da de *T. cruzi*. Além das descrições desde os o final dos anos 80 e anos 90 de que a troca genética em *T. brucei* ocorreria no inseto vertebrado (GIBSON, W., 1996; JENNI *et al.*, 1986) foi demonstrado que este parasito na verdade é capaz de realizar meiose e formar gametas. Foi demonstrado que, após passagem no inseto vetor, é possível se identificar células haploides, semelhantes a promastigotas que possuem características semelhantes a de gametas e que, quando misturadas, estas células fazem um processo de fusão citoplasmática (PEACOCK *et al.*, 2014). Nossos experimentos foram feitos com a forma epimastigota de *T. cruzi*, que é a forma replicativa dentro do inseto vetor em ambiente natural. A detecção de híbridos nesta forma levanta a possibilidade de que, assim como em *T. brucei*, o inseto vetor seja o ambiente preferível do parasito para realizar esta troca

genética, já que não foi possível recuperar células híbridas depois da passagem por infecção de células humanas (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018).

A demonstração de hibridização em *Leishmania infantum* e *Leishmania major* foi feita a partir da detecção de que estas duas populações de espécies distintas também foram capazes de trocar material genético. A partir de estudos com marcadores genéticos de isolados de pacientes imunossuprimidos em Portugal os autores demonstraram a existência de uma população que carregavam características das duas populações originais, levando os autores a sugerirem inclusive que esta fusão ocorreu em todo o genoma do parasito (RAVEL *et al.*, 2006). Outros relatos também foram reportados do isolamento de cepas híbridas em outras espécies de *Leishmania spp.* indicando que a recombinação e troca genética também pode ter um papel importante para a infecção causada pelos tripanossomatídeos (NOLDER *et al.*, 2007). Apesar da presença de homólogos de genes essenciais no processo de meiose, como o gene DMC1, até o momento não se tem a descrição de que *T. cruzi* é capaz de produzir gametas e realizar reprodução sexuada.

Curiosamente, em nossos resultados, a cepa Sylvio apresentou um nível de hibridização mais alto que o esperado, porém seus níveis de TcRad51 também foram surpreendentemente mais altos. Este resultado reforça a sugestão do papel de TcRad51 nestes eventos de recombinação genética, mas não era esperado que uma cepa de DTU não híbrida apresentasse nível tão alto quanto uma cepa de DTU híbrida para o gene TcRad51. Como dito anteriormente, é sugerido que a origem das cepas da DTU TcVI tenha se dado a partir de um evento de recombinação natural que ocorreu entre duas cepas não híbridas (ZINGALES, BIANCA *et al.*, 2012), portanto a detecção de uma cepa não híbrida que possua nível alto de TcRad51 pode levar à sugestão de que existam naturalmente estas variações, permitindo uma racionalização a partir das relações filogenéticas propostas para as DTU's na Figura 2.

Ao contrário de Gaunt e colaboradores que, em 2003, relataram que conseguiram obter os híbridos após a passagem pela infecção de células de mamíferos (GAUNT *et al.*, 2003), nosso grupo tem obtido sucesso em conseguir a detecção de híbridos na forma epimastigota. Especulamos que, no

experimento de Gaunt, a troca genética pode ter ocorrida durante a conversão da forma epimastigota para a forma tripomastigota nas culturas axênicas. Dessa forma, a passagem por células de mamíferos atuaria como pressão seletiva que os permitiu detectar os eventos de hibridização nestas populações e não seria necessariamente o estágio no qual a troca de material genético teria ocorrido.

Nosso próximo passo foi tentar investigar se as células seriam viáveis após as primeiras 24 horas. Interessantemente nossa análise após as primeiras 24 horas de hibridização demonstrou que não há diferença nos níveis detectáveis de células híbridas. Após as primeiras 24 horas três possibilidades poderiam existir na interpretação dos dados: aumento, diminuição ou manutenção dos níveis de células híbridas. No caso de aumento dos níveis de híbridos é possível que ele seja decorrente da manutenção de células híbridas das primeiras 24 horas; da replicação destas mesmas células híbridas até as 48 horas (neste caso talvez fosse observado sinais mais sutis e enfraquecidos em cada célula); e de novos eventos de hibridização de células que, por simples chances, não trocaram material genético nestas primeiras 24 horas. No caso de diminuição entre os valores após 48 horas, surge a possibilidade de que estas células seriam instáveis e não suportariam um segundo ciclo de replicação e, neste caso, acabariam se encaminhando para algum tipo de morte celular. O que foi observado foi uma manutenção dos níveis de células híbridas, indicando que estas células são viáveis e que existe algum processo que controla esta hibridização. Ainda seria necessário medir a extensão da troca genética no genoma destes parasitos, a influência deste DNA extra no metabolismo e ciclo celular destes indivíduos, bem como isolar estas células híbridas e analisar, de forma mais profunda se existem locais genômicos preferenciais para estas trocas.

Existe também a inferência de que o nível de troca genética varia de acordo não só com a população, mas também de acordo com a célula individual. Esta inferência ao questionamento de como o parasito lida com esta variação na ploidia. Uma sugestão é que exista um processo de erosão no DNA. Células que possuam níveis maiores de TcRad51 são capazes de gerar híbridos de forma mais proeminente, mas este DNA a mais poderia tornar a célula mais instável. Afim de contornar esta instabilidade do material genético, as células passariam

então por um processo de erosão do DNA, que acabaria limpando o genoma deste excesso de material genético. Este processo de erosão de DNA já foi descrito em culturas axênicas, nas quais a manutenção de células híbridas por longos períodos não é estável e é acompanhada por gradual perda de material genético (LEWIS *et al.*, 2017). Este fenômeno também foi sugerido a partir da observação de culturas contendo células híbridas de células parentais que superexpressam o gene TcRad51. Apesar do aumento no conteúdo de DNA, foi demonstrado que estes híbridos apresentam um crescimento prejudicado em comparação com suas populações parentais, uma indicação de que o conteúdo extra de DNA se torna um problema para estas células (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018). É possível, então, que o processo de erosão de DNA controle a quantidade de material genético de cada uma destas células e evite grandes instabilidades genômicas.

O papel de TcRad51 nesta troca genética demonstra a influência de uma proteína de um sistema de reparo no metabolismo de DNA mesmo sem o surgimento de danos na molécula. De fato, um processo de geração de variabilidade dependente de vias de reparo já foi demonstrado em bactérias. Foi visto que, em uma população de bactérias, uma pequena porcentagem apresenta um fenótipo de hipermutação. Nestas bactérias foi demonstrado que o sistema de reparo por erros de pareamento (MMR) é reduzido, permitindo um aumento da variabilidade genética nesta população. Esta perda do MMR levaria não ao surgimento de mutações *de novo*, mas sim à fixação de mutações de erros que ocorreriam durante a síntese e processos de recombinação (FOSTER, 2016; MATIC *et al.*, 1997; TADDEI *et al.*, 1997). Apesar destas células apresentarem um crescimento piorado devido ao surgimento destas mutações, foi demonstrado que estas células não morrem devido à este aumento na mutagênese e que a proporção de células que se encaminham para este fenótipo de hipermutação aumenta de acordo com o tempo. (FOSTER, 2016; ROSCHE; FOSTER; CAIRNS, 1999). Também foi descrito que a recombinação homóloga é mais ativa em populações de bactéria que apresentam ausência da via de MMR (MATIC *et al.*, 1997), sugerindo que a diminuição desta via, ao mesmo tempo que permite a geração de erros durante a replicação, geração de variabilidade e ganho de material genético, é acompanhada por um aumento de

recombinação, criando um cenário de alto ganho de adaptabilidade. Em casos de adversidade, esta geração de variabilidade seria vantajosa para a população. Neste contexto, a troca de material genético vista em *T. cruzi* pode ter efeito semelhante, no qual o aumento de conteúdo de DNA, mesmo que tenha potencial de atrasar o crescimento celular, ainda pode representar uma vantagem adaptativa para a população. A troca genética poderia funcionar como um mecanismo de geração de variabilidade em uma pequena porcentagem da população.

Em nossos resultados foi demonstrado que os eventos de hibridização variam entre os parasitos. Ao passo que determinados parasitos apresentam forte marcação com os dois análogos, outros apresentam pequenos pontos, sugerindo que a troca genética não necessariamente ocorre a partir de fusão completa de genomas. Gaunt e colaboradores relataram a perda de determinados alelos e o ganho de outros em células distintas. Este resultado pode ser mais uma indicação de que os eventos de hibridização em *T. cruzi* não necessariamente ocorrem a partir da fusão de genomas ou troca de grandes porções de DNA. Interessante notar que, em nossas imagens, nota-se que determinados parasitos apresentam uma quantidade muito grande de material genético trocado apenas em seu cinetoplasto. Esta observação também está de acordo com alguns relatos sobre herança e troca de material genético mitocondrial no parasito (BAPTISTA *et al.*, 2014; GAUNT *et al.*, 2003).

Neste trabalho nós também fomos capazes de observar que a troca genética não é restrita à células de uma mesma DTU. Quando foram feitas misturas de populações distintas de *T. cruzi*, foi visto que estas células foram capazes de trocar material genético com cepas de DTU 's distintas da sua de origem. Este resultado é uma comprovação de que todas as cepas analisadas se encaixam no conceito biológico de espécie. Chama a atenção os níveis observados de troca destas misturas. A presença de uma cepa não-híbrida reduziu os níveis observados anteriormente para as cepas híbridas. Apesar de não ser possível rastrear qual célula atua como doadora e qual célula atua como receptora deste material genético, tampouco determinar se a incorporação ou doação do material genético é a etapa crítica deste processo, fica claro que o

tipo celular é um fator determinante da capacidade de ambas as cepas de realizarem este processo.

Em outro trabalho de nosso grupo, utilizando o corante citoplasmático *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (ThermoFisher)*, foi demonstrado que existem eventos de fusão citoplasmática entre indivíduos de uma mesma população de *T. cruzi* (Resende, no prelo). Neste trabalho foi visto também que os níveis de parasitos que tiveram eventos de fusão citoplasmática detectada com este corante se correlacionam com os valores de hibridização detectados pelo ensaio de ADEXTA. As cepas híbridas CL Brener e Bug2149 cl 10 tiveram mais eventos de fusão citoplasmática que as cepas não híbridas analisadas. Este resultado sugere que o processo de hibridização que detectamos pode ocorrer não apenas pela troca de material genético, mas sim pela fusão de partes do corpo celular de dois parasitos.

A recombinação homóloga é fonte de variabilidade em todos os organismos. Em *T. brucei* já foi descrito o potencial que este processo tem na transferência de características de relevância epidemiológica entre linhagens (GIBSON, WENDY, 2015). O papel exato deste processo em outros fatores como a infectividade de *T. cruzi*; o decurso da Doença de Chagas; influência do hospedeiro invertebrado e do hospedeiro mamífero ainda necessita ser elucidado.

Recentemente foi visto que, durante a infecção e diferenciação em amastigotas, algumas células de *T. cruzi* da população intracelular entram em um processo de dormência, o que faz com que elas sejam também mais resistentes à agentes genotóxicos como o benzonidazol. Neste trabalho os autores hipotetizam que o processo de recombinação homóloga pode estar relacionado com esta parada de crescimento (SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018). Já foi visto também que os níveis menores de TcRad51 resultam em um número menor de amastigotas depois de 24 horas de infecção *in vitro*. De forma análoga, a superexpressão de TcRad51 leva à um aumento do número de amastigotas, principalmente após 72 horas após infecção (GOMES PASSOS SILVA *et al.*, 2018). Também foi visto que, após a irradiação com radiação ionizante, *T. cruzi* entra em um estado de parada de crescimento e que TcRad51 está diretamente

envolvida com a recuperação desta parada (GOMES PASSOS SILVA *et al.*, 2018; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Juntos estes resultados podem sugerir que a recombinação tem papel crucial durante a infecção e crescimento de *T. cruzi* durante a infecção. Desta forma, os eventos de troca genética também podem estar relacionados com a infecção causada pelo parasito, talvez atuando em mecanismos de geração de variabilidade para *T. cruzi* ou na indução e retomada do processo de dormência após a diferenciação em amastigotas.

Importante ressaltar que os eventos aqui descritos, em nosso trabalho anterior (ALVES, CERES LUCIANA *et al.*, 2018) e descritos por Gaunt e colaboradores (2003) são discutidos como sendo eventos de ganho de material genético que depois, a partir de processos que ainda necessitam ser investigados, seria perdido afim de se restaurar o conteúdo genômico correto destas células. A descoberta de que nem mesmos os mecanismos parassexuais, juntamente da expansão clonal, são capazes de explicar a estrutura populacional natural de *T. cruzi* levanta a hipótese de que estes parasitos são capazes de realizar algum processo semelhante à meiose. A detecção de sequências decorrentes de meiose em *T. cruzi* ainda é recente e esta evidência de que possa existir um ciclo de reprodução sexual, abre um novo entendimento sobre a patogênese da Doença de Chagas (SCHWABL *et al.*, 2018). O papel dos mecanismos de conversão gênica; como ocorreria esta meiose no parasito; se este processo seria o mesmo em DTU's híbridas e não híbridas; e o exato papel pelo qual a troca de material genético e mecanismos sexuais de reprodução teriam no parasito ainda necessita ser compreendido.

A descrição da transferência horizontal de genes e de mecanismos parassexuais em *T. cruzi* abre caminhos interessantes. Com relação especificamente à troca de material genético, muitas questões acerca da importância do processo de recombinação ainda necessitam ser elucidadas. Ainda se torna necessário investigar se estes híbridos são células viáveis, uma vez que este ensaio mostra uma limitação para detecção nas primeiras 24 horas do experimento. Além disso, é interessante investigar, em um contexto genômico, se existem loci preferenciais para esta troca e se, caso realmente esteja ocorrendo um processo de limpeza deste material genético extra, via erosão do DNA, como este processo influencia no genoma do parasito e em

outros processos que dependem do metabolismo de DNA. Também não compreendemos que papel esta troca de material genético poderia ter na alteração de ploidia, no balanço gênico e em outros processos de metabolismo do DNA do parasito.

6. Conclusões

Eventos de troca genética são descritos em tripanossomatídeos desde a década de 1980, porém, até este trabalho, a única demonstração em condições laboratoriais deste fenômeno havia sido em 2003, por Gaunt e colaboradores. Neste trabalho fomos capazes de desenvolver um ensaio de imunofluorescência capaz de detectar e quantificar eventos de troca de material genético a partir do uso de análogos de timidina. Nossos resultados demonstram que esta técnica é uma forma viável de se rastrear eventos de troca genética no parasito. Também pudemos demonstrar que parasitos de uma mesma população de *T. cruzi* são capazes de trocar material genético entre eles e que esta troca não está restrita apenas à sua linhagem, comprovando que todas as linhagens de *T. cruzi* são de uma mesma espécie, já que são capazes de receber e doar material genético umas das outras. Demonstramos também que os eventos de troca genética estão associados com os níveis de TcRad51 destas cepas, uma indicação de que o processo de recombinação homóloga é de fundamental importância para o parasito. O protocolo de ADEXTa é uma ferramenta simples e com capacidade de permitir a comparação fácil do surgimento de eventos de hibridização em células.

7. Referências Bibliográficas

AGUIAR, Pedro H.N. *et al.* Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in Trypanosoma cruzi Cell Viability. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002279.g008>>. Acesso em: 23 maio 2014.

AKOPYANTS, Natalia S. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. *Science*, v. 324, n. 5924, p. 265–268, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2729066&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

ALEXEYEV, Mikhail *et al.* The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 5, n. 5, p. 1–17, 2013. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/5/a012641.full>>.

ALFONZO, Juan D.; THIEMANN, Otavio; SIMPSON, Larry. The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 19, p. 3751–3759, 1997.

ALLINSON, S. L.; DIANOVA, I. I.; DIANOV, G. L. DNA polymerase β is the major dRP lyase involved in repair of oxidative base lesions in DNA by mammalian cell extracts. *EMBO Journal*, 2001.

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990.

ALVES, Ceres Luciana *et al.* The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in Trypanosoma cruzi. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

ALVES, João M.P. *et al.* Endosymbiosis in trypanosomatids: The genomic cooperation between bacterium and host in the synthesis of essential amino acids is heavily influenced by multiple horizontal gene transfers. *BMC Evolutionary Biology*, 2013.

ALVES, João M.P. *et al.* Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS ONE*, 2011.

AMEISEN, J-C. *et al.* Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Parasitology Today*, 1996.

ANDERSON, C T; FRIEDBERG, E C. The presence of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase in extracts of human KB cells. *Nucleic Acids Res*, 1980.

ANDRADE, Luciana O. *et al.* Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: An in vitro study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 6, p. 834–837, 2010.

ANDRADE, Luciana O. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental Parasitology*, v. 100, n. 4, p. 269–275, 2002.

ÁNGEL, Vizoso-Vázquez *et al.* HMGB Proteins from Yeast to Human. Gene Regulation, DNA Repair and Beyond. *Old Yeasts - New Questions*. [S.l.]: InTech, 2017. v. I. p. 156–165. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/old-yeasts-new-questions/hmgb-proteins-from-yeast-to-human-gene-regulation-dna-repair-and-beyond>>.

ARAÚJO, Patrícia R. *et al.* Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. *Parasitology International*, v. 60, n. 2, p. 161–169, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.01.006>>.

ASSIS, Antônio Vincícius De. *Lesões no DNA nuclear e mitocondrial de Trypanosoma cruzi sinalizam para diferentes tipos de morte*. 2019. 1–90 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

AVLIYAKULOV, Nuraly K.; LUKEŠ, Julius; RAY, Dan S. Mitochondrial histone-like DNA-binding proteins are essential for normal cell growth and mitochondrial function in *Crithidia fasciculata*. *Eukaryotic Cell*, 2004.

AZUAJE, Francisco J.; RAMIREZ, Jose L.; DA SILVEIRA, Jose F. In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Kinetoplastid Biology and Disease*, v. 6, p. 6, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1965468&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 ago. 2013.

BAPTISTA, Rodrigo de Paula *et al.* Evidence of substantial recombination among *Trypanosoma cruzi* II strains from Minas Gerais. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 22, p. 183–191, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296011>>. Acesso em: 15 maio 2014.

BARZILAI, Ari; YAMAMOTO, Ken Ichi. *DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair*. [S.l: s.n.], 2004

BASU, Alakananda; KRISHNAMURTHY, Soumya. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2010, n. 2, p. 1–16, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jna/2010/201367/>>.

BELLERA, Carolina L. *et al.* Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: Discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 2402–2408, 2013.

BENNE, Rob *et al.* Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, v. 46, n. 6, p. 819–826, maio 1986.

BIANCHI, Néstor O.; BIANCHI, Martha S.; RICHARD, Silvina M. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 488, n. 1, p. 9–23, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223402>>.

BISWAS, Anup Kumar; MITCHELL, David L.; JOHNSON, David G. E2F1 responds to ultraviolet radiation by directly stimulating DNA repair and suppressing carcinogenesis. *Cancer Research*, 2014.

BODE, Ann M.; DONG, Zigang. *The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and*

cancer. *Cancer Letters*. [S.l: s.n.]. , 2007

BOITEUX, Serge; COSTE, Franck; CASTAING, Bertrand. *Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases*. *Free Radical Biology and Medicine*. [S.l: s.n.]. , 2017

BORST, P. Why kinetoplast DNA networks? *Trends in Genetics*, v. 7, n. 5, p. 139–141, 2 maio 1991. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90374-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525(91)90374-Y)>.

BRANZEI, Dana; FOIANI, Marco. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 4, p. 297–308, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18285803>.

BRENER, Zigman. Biology of Trypanosoma Cruzi. *Annual Review of Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 347–382, 1973. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>>.

BRISSE, Sylvain *et al.* Evidence for genetic exchange and hybridization in Trypanosoma cruzi based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 2, n. 3, p. 173–83, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797979>>.

BRISSE, Sylvain; BARNABÉ, Christian; TIBAYRENC, Michel. Identification of six Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 1, p. 35–44, 2000.

BRISSE, Sylvain; DUJARDIN, Jean Claude; TIBAYRENC, Michel. Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, n. 1, p. 95–105, 2000.

BURGOS, Juan M. *et al.* Differential Distribution of Genes Encoding the Virulence Factor Trans-Sialidase along Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. 9–11, 2013.

BUSCAGLIA, Carlos A.; DI NOIA, Javier M. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 5, p. 419–427, 2003.

BUSTOS, Patricia L. *et al.* A homolog of cyclophilin D is expressed in Trypanosoma cruzi and is involved in the oxidative stress–damage response. *Cell Death Discovery*, 2017.

CAGNEY, Gerard *et al.* Functional genomics of the yeast DNA-damage response. *Genome Biology*, v. 7, n. 9, p. 7–10, 2006.

CALDERANO, Simone Guedes *et al.* Single molecule analysis of Trypanosoma brucei DNA replication dynamics. *Nucleic Acids Research*, 2015.

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

CAROLAING GABALDÓN, M. *et al.* Trypanosoma cruzi: A kinetoplast-associated protein of the photolyase/cryptochrome family. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 3, p. 350–356, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.004>>.

CATTA-PRETA, Carolina M.C. *et al.* Endosymbiosis in trypanosomatid protozoa: The bacterium division is controlled during the host cell cycle. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. JUN, p. 1–13, 2015.

CAVALCANTI, Danielle Pereira *et al.* Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of Trypanosoma cruzi. *BMC Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 120, 2009. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-120>>.

CHAMBERLAIN, Graham R.; TULUMELLO, David V.; KELLEY, Shana O. Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria. *ACS Chemical Biology*, v. 8, n. 7, p. 1389–1395, 2013.

CHATTOPADHYAY, Ranajoy *et al.* Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. *Nucleic Acids*

Research, v. 34, n. 7, p. 2067–2076, 2006.

CHEN, J. *et al.* Cloning a eukaryotic DNA glycosylase repair gene by the suppression of a DNA repair defect in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989.

CHEN, Jia; FURANO, Anthony V. Breaking bad: The mutagenic effect of DNA repair. *DNA Repair*, v. 32, p. 43–51, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26073774>%5Cn<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786415001044>>.

CHEN, Xuejing *et al.* Kinetic gating mechanism of DNA damage recognition by Rad4/XPC. *Nature Communications*, v. 6, p. 5849, 2015.

CIMPRICH, Karlene A.; CORTEZ, David. ATR: An essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 8, p. 616–627, 2008.

CLAROS, Manuel G.; VINCENS, Pierre. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, 1996.

CLAYTON, D. A.; DODA, J. N.; FRIEDBERG, E. C. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 71, n. 7, p. 2777–2781, 1974. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.71.7.2777>>.

CLINE, Susan D. Mitochondrial DNA damage and its consequences for mitochondrial gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1819, n. 9–10, p. 979–991, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.06.002>>.

COPELAND, William C.; LONGLEY, Matthew J. Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA Repair*, v. 19, p. 190–198, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.010>>.

CORPET, Florence. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 1988.

CROWLEY, Lisa C. *et al.* Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016.

D'ERRICO, Mariarosaria *et al.* The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2013.

DA SILVA, Marcelo *et al.* Analysis of DNA Exchange Using Thymidine Analogs (ADExTA) in *Trypanosoma cruzi*. *Bio-Protocol*, v. 8, n. 24, p. 1–18, 2018.

DA SILVA, Marcelo S. *et al.* Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 11, p. 858–874, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.002>>.

DAVIDSON, Richard L.; KAUFMAN, Elliot R. Resistance to bromodeoxyuridine mutagenesis and toxicity in mammalian cells selected for resistance to hydroxyurea. *Somatic Cell Genetics*, 1979.

DE MOURA, Michelle Barbi *et al.* Cloning and characterization of DNA polymerase η from *Trypanosoma cruzi*: Roles for translesion bypass of oxidative damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 51, n. 1, p. 229–235, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.029>><http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.022>><http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.043>>[http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61030-9)><http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.0>>.

DE SOUZA-PINTO, Nadja C. *et al.* Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair*, v. 8, n. 6, p. 704–719, 2009.

DE SOUZA, Silvana Sant Anna *et al.* Expanded repertoire of kinetoplast associated proteins and unique mitochondrial DNA arrangement of symbiont-bearing trypanosomatids. *PLoS ONE*, v. 12, n. 11, p. 1–17, 2017.

DEANS, Andrew J.; WEST, Stephen C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 7, p. 467–480, 2011. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2170>>

1511&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/nrc3088>.

DITCH, Scott; PAULL, Tanya T. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: Beyond the DNA damage response. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 37, n. 1, p. 15–22, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2011.10.002>>.

DOWNEY, Nick *et al.* Mitochondrial DNA Ligases of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 4, p. 765–774, 2005.

DU, Y; MASLOV, D A; CHANG, K P. Monophyletic origin of beta-division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994.

DUFFY, Craig W. *et al.* Population Genetics of *Trypanosoma brucei rhodesiense*: Clonality and Diversity within and between Foci. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 11, 2013.

DULBECCO, R. *Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light [2]*. *Nature*. [S.l: s.n.], 1949

EL-SAYED, Najib M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 409–15, 15 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>>. Acesso em: 23 maio 2014.

EPE, Bernd. DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 11, n. 1, p. 98–106, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1PP05190C>>.

FERREIRA, Wesley Roger. *Desvendando o reparo de DNA mitocondrial em Trypanosoma cruzi*. 2019. Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5,

p. 755–759, jan. 1987.

FINN, Robert D. *et al.* *Pfam: The protein families database. Nucleic Acids Research*. [S.l.: s.n.], 2014

FONSECA, Sonali B. *et al.* Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. *Chemistry and Biology*, v. 18, n. 4, p. 445–453, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.02.010>>.

FOSTER, Patricia L. Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria *Stress*. v. 9238, n. June, 2016.

FREIRE, Anna Cláudia Guimarães *et al.* Catalase expression impairs oxidative stress-mediated signalling in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v. 144, n. 11, p. 1498–1510, 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182017001044/type/journal_article>.

FRIEDBERG, Errol C. *et al.* *DNA repair and mutagenesis*. [S.l.: s.n.], 2006. v. 26. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200608000-00017>>.

FRIEDBERG, Errol C. Nucleotide excision repair of DNA: The very early history. *DNA Repair*, v. 10, n. 7, p. 668–672, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.018>>.

FU, Dragony; CALVO, Jennifer A.; SAMSON, Leona D. *Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nature Reviews Cancer*. [S.l.: s.n.], 2012

FURTADO, Carolina *et al.* Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. e42484, jan. 2012.

GAUNT, Michael W. *et al.* Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, v. 421, n. February, p. 936–939, 2003.

GIBSON, W. Genetic exchange in trypanosomes. *Bulletin et m??moires de*

l'Académie royale de médecine de Belgique, v. 151, n. 2, p. 203–210, 1996.

GIBSON, W. C.; DE, T. F.; GODFREY, D. G. Numerical Analysis of Enzyme Polymorphism: A New Approach to the Epidemiology and Taxonomy of Trypanosomes of the Subgenus Trypanozoon. *Advances in Parasitology*, 1980.

GIBSON, Wendy. *Liaisons dangereuses: Sexual recombination among pathogenic trypanosomes*. *Research in Microbiology*. [S.l: s.n.], 2015

GIORGIO, Valentina *et al.* Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*. [S.l: s.n.], 2018

GOMES PASSOS SILVA, Danielle *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. e0006875, 13 nov. 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006875>>.

GONZÁLEZ-TORRES, Pedro *et al.* Impact of Homologous Recombination on the Evolution of Prokaryotic Core Genomes. *mBio*, v. 10, n. 1, p. 1–17, jan. 2019.

GRAMS, Jayleen *et al.* A Trypanosome Mitochondrial RNA Polymerase Is Required for Transcription and Replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 19, p. 16952–16959, 8 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M100662200>>.

GRYNBERG, Priscila *et al.* Trypanosoma cruzi gene expression in response to gamma radiation. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. e29596, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256153&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

HAMMARTON, Tansy C. *Cell cycle regulation in Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. [S.l: s.n.], 2007

HANAWALT, Philip C. Historical perspective on the DNA damage response. *DNA Repair*, v. 36, n. 24, p. 2–7, dez. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786415001974>>.

HANAWALT, Philip C.; SPIVAK, Graciela. *Transcription-coupled DNA repair: Two decades of progress and surprises*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

[S.l: s.n.]. , 2008

HANCOCK, Aneeka *et al.* Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo? *Behavioural Brain Research*, 2009.

HARMER, Jane *et al.* Farming, slaving and enslavement: histories of endosymbioses during kinetoplastid evolution. *Parasitology*, v. 145, n. 10, p. 1311–1323, 2018.

HARTWELL, L H; KASTAN, M B. Cell cycle control and cancer. [Review]. *Science*, 1994.

HEYER, Wolf-Dietrich; EHMSSEN, Kirk T.; LIU, Jie. Regulation of Homologous Recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics*, v. 244, n. 6, p. 113–139, 2010.

HEYER, Wolf Dietrich. *Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. Topics in Current Genetics*. [S.l: s.n.]. , 2007

HILTON, Benjamin A. *et al.* ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Molecular Cell*, v. 60, n. 1, p. 35–46, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.008>>.

HINES, Jane C.; RAY, Dan S. Tandem arrangement of two genes encoding kinetoplast-associated H1 histone-like proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 89, n. 1, p. 41–49, 1997.

HOEIJMAKERS, Jan H J. Genome maintenance mechanism for preventing cancer. *Nature*, v. 411, n. May 17, p. 366–374, 2001.

HOEIJMAKERS, Jan H J. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 128, n. 7–8, p. 460–462, 2007.

HOFFMAN, K.; BARON, M. *BOXSHADE interface*. . [S.l: s.n.]. , 1992

HOLLAR, Laura; LUKEŠ, Julius; MASLOV, Dmitri A. Monophyly of endosymbiont

containing trypanosomatids: Phylogeny versus taxonomy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1998.

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

HOOGSTRATEN, Deborah *et al.* Erratum: Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC (Journal of Cell Science (2008) vol. 121 (2850-2859)). *Journal of Cell Science*, v. 121, n. 23, p. 3991, 2008.

HORTON, Kristin L. *et al.* Mitochondria-Penetrating Peptides. *Chemistry and Biology*, v. 15, n. 4, p. 375–382, 2008.

HOTEZ, Peter J. *et al.* Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, p. 4–7, 2012.

HOWELL, Neil. Human Mitochondrial Diseases: Answering Questions and Questioning Answers. *International Review of Cytology*, v. 186, n. 409, p. 49–116, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769608610517>>.

HU, Jennifer J. *et al.* The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutation Research-DNA Repair*, v. 336, n. 2, p. 193–201, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7885389>>.

HUANG, Huifang *et al.* Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. *Science*, 1995.

HUANG, Yaling; LI, Lei. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. *Translational cancer research*, v. 2, n. 3, p. 144–154, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3755464&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

ICHINOE, Akimasa *et al.* Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts. *Nucleic*

Acids Research, 2004.

INBAR, Ehud *et al.* The Mating Competence of Geographically Diverse *Leishmania major* Strains in Their Natural and Unnatural Sand Fly Vectors. *PLoS Genetics*, v. 9, n. 7, 2013.

ISHIDA, S. *et al.* Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 22, p. 14298–14302, 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162491399>>.

JACOBS, Angelika L.; SCHÄR, Primo. *DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. Chromosoma*. [S.l: s.n.], 2012

JENNI, L. *et al.* Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, v. 322, n. 6075, p. 173–175, 1986. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/322173a0>>.

JENSEN, Robert E.; ENGLUND, Paul T. Network News: The Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 473–491, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-092611-150057>>.

JIANG, Xu; WANG, Jun. Down-regulation of TFAM increases the sensitivity of tumour cells to radiation via p53/TIGAR signalling pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 23, n. 7, p. 4545–4558, 2019.

JURADO, Juan *et al.* Role of mismatch-specific uracil-DNA glycosylase in repair of 3,N 4-ethenocytosine in vivo. *DNA Repair*, v. 3, n. 12, p. 1579–1590, 2004.

KAMENISCH, York *et al.* Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *Journal of Experimental Medicine*, v. 207, n. 2, p. 379–390, 2010.

KAYAMA, Hisako; TAKEDA, Kiyoshi. *The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. Microbes and Infection*. [S.l: s.n.], 2010

KAZAK, Lawrence; REYES, Aurelio; HOLT, Ian J. Minimizing the damage: Repair

pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 10, p. 659–671, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3439>>.

KELNER, A. Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated Escherichia Coli, With Special Reference To the Dose-Reduction Principle and To Ultraviolet-Induced Mutation. *Journal of bacteriology*, v. 58, n. 4, p. 511–522, 1949.

KERZENDORFER, Claudia; O'DRISCOLL, Mark. UVB and caffeine: Inhibiting the DNA damage response to protect against the adverse effects of UVB. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 129, n. 7, p. 1611–1613, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.99>>.

KLEIN, Cecilia C. *et al.* Biosynthesis of vitamins and cofactors in bacterium-harboring trypanosomatids depends on the symbiotic association as revealed by genomic analyses. *PLoS ONE*, 2013.

KONG, Ying *et al.* Homologous recombination drives both sequence diversity and gene content variation in *Neisseria meningitidis*. *Genome Biology and Evolution*, v. 5, n. 9, p. 1611–1627, 2013.

KOOPMAN, G *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994.

KOPINSKI, Piotr K. *et al.* Regulation of nuclear epigenome by mitochondrial DNA heteroplasmy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 32, p. 16028–16035, 2019.

KOSTYGOV, Alexei Y. *et al.* Novel trypanosomatid-bacterium association: Evolution of endosymbiosis in action. *mBio*, 2016.

KREJCI, Lumir *et al.* *Homologous recombination and its regulation*. *Nucleic Acids Research*. [S.l: s.n.], 2012

KROKAN, Hans E.; DRABLØS, Finn; SLUPPHAUG, Geir. Uracil in DNA - Occurrence, consequences and repair. *Oncogene*, v. 21, n. 58 REV. ISS. 8, p. 8935–8948, 2002.

KUNRATH-LIMA, Marianna *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* MutY

DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 55, n. September, p. 332–342, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.030>>.

KUNRATH-LIMA, Marianna. *O Sistema GO em Trypanosoma cruzi: caracterização dos genes TcOGG1 e TcMYH*. 2013. 1–112 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

LAUDET, Vincent; STEHELIN, Dominique; CLEVERS, Hans. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Research*, 1993.

LEE, Chih Hung *et al.* Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013.

LEWIS, M. D. *et al.* Experimental and natural recombination in *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*. [S.l.: s.n.], 2017. p. 455–473.

LI, Guo Min. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, v. 18, n. 1, p. 85–98, 2008.

LI, Xuan; HEYER, Wolf-Dietrich. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, v. 18, n. 1, p. 99–113, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/cr.2008.1>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

LIEBER, Michael R. *et al.* Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 4, n. 9, p. 712–720, 2003.

LINDAHL, Tomas; NYBERG, Barbro. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry*, v. 11, n. 19, p. 3610–3618, 1972.

LIU, Beiyu *et al.* *Fellowship of the rings: The replication of kinetoplast DNA*. *Trends in Parasitology*. [S.l.: s.n.], 2005

LIU, Jing *et al.* XPD localizes in mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 11, p.

5476–5488, 2015.

LIU, Yongqing *et al.* Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 7, p. 4191–4196, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0630387100>>.

LLEWELLYN, Martin S.; MILES, Michael A.; *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 5, 2009.

LLEWELLYN, Martin S.; LEWIS, Michael D.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* Ilc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 9, 2009.

LOON, Barbara Van; SAMSON, Leona D. Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) localizes to mitochondria and interacts with mitochondrial single-stranded binding protein (mtSSB). *DNA Repair*, v. 12, n. 3, p. 177–187, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.11.009>>.

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

LUKES, Julius *et al.* Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell*, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002. Disponível em: <<http://ec.asm.org/content/1/4/495.full.pdf>>.

LUKEŠ, Julius *et al.* Disruption of the *Crithidia fasciculata* KAP1 gene results in structural rearrangement of the kinetoplast disc. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2001.

MACHADO-SILVA, Alice *et al.* How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutation Research -*

Reviews in Mutation Research, v. 767, n. September 2017, p. 8–22, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>>.

MACHADO, Carlos R. *et al.* Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: Specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription. *Molecular Microbiology*, v. 92, n. 4, p. 756–776, 2014.

MAILLOUX, Ryan J. Mitochondrial Antioxidants and the Maintenance of Cellular Hydrogen Peroxide Levels. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2018, n. 1, p. 7857251, 2018.

MANCHEKAR, Medha *et al.* DNA recombination activity in soybean mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 2006.

MARKKANEN, Enni; DORN, Julia; HÜBSCHER, Ulrich. MUTYH DNA glycosylase: The rationale for removing undamaged bases from the DNA. *Frontiers in Genetics*, v. 4, n. FEB, p. 1–20, 2013.

MARNETT, Lawrence J.; PLASTARAS, John P. *Endogenous DNA damage and mutation. Trends in Genetics*. [S.l: s.n.]. , 2001

MARTEIJN, Jurgen A. *et al.* Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 7, p. 465–481, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3822>>.

MARTI, T. M. *et al.* H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 26, p. 9891–9896, 2006. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603779103>>.

MASON, Penelope A. *et al.* Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Research*. [S.l: s.n.]. , 2003

MATIC, I. *et al.* Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science*, v. 277, n. 5333, p. 1833–1834, 1997.

MCCUTCHEON, John P.; MORAN, Nancy A. *Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. Nature Reviews Microbiology*. [S.l: s.n.]. , 2012

MEJIA, Ana Maria *et al.* Benzimidazole-resistance in *trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 2, p. 220–228, 2012.

MELIS, Joost P.M.; VAN STEEG, Harry; LUIJTEN, Mirjam. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 18, n. 18, p. 2409–2419, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.5036>>.

MENDES, Isabela Cecília. *O papel dos genes TcCSB e TcXPC no metabolismo de DNA em Trypanosoma cruzi*. 2015. 2015.

MENNA-BARRETO, Rubem Figueiredo Sadok. *Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill*. *Cell Death and Disease*. [S.l.: s.n.], 2019

MESSENGER, Louisa A.; MILES, Michael A. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v. 151, n. 1, p. 150–155, 2015.

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. *The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine)*. *Journal of Bacteriology*. [S.l.: s.n.], 1992

MILESHINA, Daria *et al.* Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration. *Nucleic Acids Research*, 2011.

MINCZUK, Michal *et al.* TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Research*, 2011.

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

MOLYNEUX, David H.; SAVIOLI, Lorenzo; ENGELS, Dirk. Neglected tropical diseases: Progress towards addressing the chronic pandemic. *The Lancet*, v. 6736, n. 16, 2016.

MOREL, Frederic *et al.* Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of *Drosophila* cells are repaired. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008.

MORI, Mateus P. *et al.* Lack of XPC leads to a shift between respiratory complexes I and II but sensitizes cells to mitochondrial stress. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 155, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-00130-x>>.

MORINI, Flávia Souza. *Caracterização de TcKAP7 : uma proteína associada ao cinetoplasto do protozoário Trypanosoma cruzi*. 2015. 2015.

MORRIS, G. *et al.* *Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists*. *Molecular Neurobiology*. [S.l: s.n.], , 2018

MOTTA, Maria Cristina M. *et al.* Detection of penicillin-binding proteins in the endosymbiont of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1997.

MOTTA, Maria Cristina Machado *et al.* Predicting the Proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and Their Respective Endosymbionts Reveals New Aspects of the Trypanosomatidae Family. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, 2013.

MOTTA, Maria Cristina Machado *et al.* The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. *PLoS ONE*, v. 5, n. 8, p. 20–21, 2010.

MOYA, Andrés *et al.* *Learning how to live together: Genomic insights into prokaryote-animal symbioses*. *Nature Reviews Genetics*. [S.l: s.n.], , 2008

MU, Jung Jung *et al.* A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3- related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *Journal of Biological Chemistry*, 2007.

NAKABEPPU, Y. Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 2001.

NEMZOW, Leah *et al.* XPC: Going where no DNA damage sensor has gone before. *DNA Repair*, v. 36, p. 19–27, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786415001792>>.

NIVARD, Madeleine J.M.; PASTINK, Albert; VOGEL, Ekkehart W. Impact of DNA nucleotide excision repair on methyl methanesulfonate-induced mutations in *Drosophila melanogaster*. *Carcinogenesis*, 1993.

NOLDER, Debbie *et al.* Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (Viannia) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 76, n. 3, p. 573–578, 2007. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2007.76.573>>.

NOWACK, Eva C.M.; GROSSMAN, Arthur R. 12 Evolutionary pressures and the establishment of endosymbiotic associations. *Microbial Evolution under Extreme Conditions*. [S.l: s.n.], 2015. .

O'CONNOR, Timothy R.; LAVAL, Jacques. Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 176, n. 3, p. 1170–1177, 1991.

OCANA-MAYORGA, Sofía *et al.* Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 12, p. 1–8, 2010.

OHNDORF, Uta Maria *et al.* Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature*, v. 399, n. 6737, p. 708–712, 1999.

PAIVA, Claudia N. *et al.* Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 7, p. 2531–2542, 2 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728935>0A<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3386808>0A<<http://www.jci.org/articles/view/58525>>.

PAIVA, Claudia N.; MEDEI, Emiliano; BOZZA, Marcelo T. *ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart*. *PLoS Pathogens*. [S.l: s.n.], 2018

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

PASCUCCI, B. *et al.* Role of nucleotide excision repair proteins in oxidative DNA damage repair: an updating. *Biochemistry (Moscow)*, 2011.

PEACOCK, Lori *et al.* Meiosis and haploid gametes in the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Current Biology*, v. 24, n. 2, p. 181–186, 2014. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.044>>.

PETTEPHER, C. C. *et al.* Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin. *Journal of Biological Chemistry*, 1991.

PIACENZA, Lucía *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochemical Journal*, 2007.

PIACENZA, Lucía *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochemical Journal*, 2008.

PIACENZA, Lucía *et al.* *Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection*. *Current Opinion in Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2009

PIACENZA, Lucía; TRUJILLO, Madia; RADI, Rafael. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *The Journal of experimental medicine*, p. jem.20181886, 2019. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30792185>>.

PIÑEYRO, María Dolores *et al.* Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene*, 2008.

PINZ, Kevin G.; BOGENHAGEN, Daniel F. Efficient Repair of Abasic Sites in DNA by Mitochondrial Enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, n. 3, p. 1257–1265, 2015.

PODRATZ, Jewel L. *et al.* Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal

root ganglion neurons. *Neurobiology of Disease*, v. 41, n. 3, p. 661–668, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.11.017>>.

POVIRK, Lawrence F.; SHUKER, David E. *DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. [S.l.: s.n.], 1994

PRAKASH, Satya; JOHNSON, Robert E.; PRAKASH, Louise. EUKARYOTIC TRANSLESION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry*, v. 74, n. 1, p. 317–353, 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250>>.

PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1, n. September, p. 92–100, set. 2001.

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

RAJÃO, Matheus Andrade. *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*. 2011. 133 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

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

RAMÍREZ, César; PUERTA, Concepción; REQUENA, Jose M. Evidence of RNA editing in *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Parasitology Research*, v. 108, n. 3, p. 731–739, 2011.

RAMÍREZ, Juan David; LLEWELLYN, Martin S. Reproductive clonality in protozoan pathogens - Truth or artefact? *Molecular Ecology*, v. 23, n. 17, p. 4195–4202, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mec.12872>>.

RASTOGI, Rajesh P. *et al.* Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2010, p. 1–32, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jna/2010/592980/>>.

RAVANAT, Jean Luc; DOUKI, Thierry; CADET, Jean. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 63, n. 1–3, p. 88–102, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684456>>.

RAVEL, Christophe *et al.* First report of genetic hybrids between two very divergent Leishmania species: Leishmania infantum and Leishmania major. *International Journal for Parasitology*, v. 36, n. 13, p. 1383–1388, 2006.

READ, Laurie K.; LUKEŠ, Julius; HASHIMI, Hassan. Trypanosome RNA editing: The complexity of getting U in and taking U out. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 7, n. 1, p. 33–51, 2016.

REGIS-DA-SILVA, Carlos Gustavo *et al.* Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 149, n. 2, p. 191–200, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828179>>. Acesso em: 1 jun. 2013.

RIOU, G.; DELAIN, E. Electron Microscopy of the Circular Kinetoplastic Dna From Trypanosoma Cruzi: Occurrence of Catenated Forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 62, n. 1, p. 210–217, 1969. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.62.1.210>>.

ROSCHE, William A.; FOSTER, Patricia L.; CAIRNS, John. The role of transient hypermutators in adaptive mutation in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999.

SAHA, Janapriya; WANG, Minli; CUCINOTTA, Francis A. Investigation of switch from ATM to ATR signaling at the sites of DNA damage induced by low and high LET radiation. *DNA Repair*, v. 12, n. 12, p. 1143–1151, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.10.004>>.

SALDIVAR, Joshua C.; CORTEZ, David; CIMPRICH, Karlene A. The essential

kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 18, n. 10, p. 622–636, 2017.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, Fernando J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *eLife*, v. 7, p. 1–20, 2018.

SCHAMBER-REIS, Bruno Luiz Fonseca *et al.* DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 183, n. 2, p. 122–131, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685112000497>>.

SCHEIBYE-KNUDSEN, Morten *et al.* Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 209, n. 4, p. 855–869, 9 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20111721>>.

SCHWABL, Philipp *et al.* Parallel sexual and parasexual population genomic structure in *Trypanosoma cruzi*. *bioRxiv*, n. Cd, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/338277>>.

SHAPIRO, T. A. Selective Cleavage of Kinetoplast DNA Minicircles Promoted by Antitrypanosomal Drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990.

SHAPIRO, T A; ENGLUND, P T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 117–143, 1995. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.49.100195.001001>>.

SHERWOOD, Racquel K.; BENNETT, Richard J. *Fungal meiosis and parasexual reproduction - lessons from pathogenic yeast. Current Opinion in Microbiology*. [S.l: s.n.]. , 2009

SHILOH, Yosef; ZIV, Yael. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 14, n. 4, p. 197–210, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486281>>.

SIA, Elaine A. Mitochondrial DNA repair and damage tolerance. *Frontiers in Bioscience*, v. 22, n. 5, p. 4525, 2017. Disponível em: <<https://www.bioscience.org/2017/v22/af/4525/list.htm>>.

SIDDIK, Zahid H. *Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. *Oncogene*. [S.l: s.n.], 2003

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

SIMPSON, L. *et al.* The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 29, n. 5 II, p. 1053–1063, 1980. Disponível em: <[http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab publications/LS-32-37.pdf](http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab%20publications/LS-32-37.pdf)>.

SMITH, Joanne *et al.* The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research*, v. 108, n. C, p. 73–112, 2010.

SOBOL, Robert W. *et al.* The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, 2000.

SOUSA, Paloma Leão *et al.* Betulinic acid induces cell death by necrosis in Trypanosoma cruzi. *Acta Tropica*, 2017.

SOUZA, Flavia Sá Pereira 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.

STEVENSNER, Tinna *et al.* Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene*, 2002.

ŠTROS, M.; LAUNHOLT, D.; GRASSER, K. D. The HMG-box: A versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, n. 19–20, p. 2590–2606, 2007.

STURM, Nancy R.; SIMPSON, Larry. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell*, v. 61, n. 5, p. 879–884, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1693097>>.

SUGASAWA, Kaoru. *Xeroderma pigmentosum genes: Functions inside and outside DNA repair. Carcinogenesis*. [S.l: s.n.], 2008

TADDEI, F *et al.* Genetic variability and adaptation to stress. In: BIJLSMA, RUDOLF; LOESCHCKE, VOLKER (Org.). . *Exs*. Basel\Switzerland: [s.n.], 1997. v. 83. p. 271–290. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342853>>.

TAKAO, Masashi *et al.* Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Research*, 1999.

TANIDA, Satoshi *et al.* Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: Potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. *International Journal of Surgical Oncology*, v. 2012, 2012.

TEIXEIRA, Marta M.G. *et al.* Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*, v. 162, n. 3, p. 503–524, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2011.01.001>>.

TEIXEIRA, S. M.R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 12, p. 1503–1516, 1998.

TETLEY, L *et al.* Onset of expression of the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly studied using immunoelectron microscopy. *Journal of cell science*, 1987.

THYAGARAJAN, Bhaskar; PADUA, Rodolfo A.; CAMPBELL, Colin. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1996.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Reproductive clonality of pathogens: A perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 48, p. E3305–E3313, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1212452109>>.

TIBAYRENC, Michel. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.

TIBAYRENC, Michel; AYALA, Francisco J. Reproductive clonality in protozoan pathogens - Truth or artifact? A comment on Ramírez and Llewellyn. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 23, p. 5778–5781, 2015a.

TIBAYRENC, Michel; AYALA, Francisco J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 9, p. 405–410, 2002.

TIBAYRENC, Michel; AYALA, Francisco J. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta Tropica*, v. 151, n. 1, p. 156–165, 2015b.

TKACH, Johnny M. *et al.* Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nature Cell Biology*, v. 14, n. 9, p. 966–976, 2012.

TREMEAU-BRAVARD, Alexandre *et al.* Fate of RNA Polymerase II Stalled at a Cisplatin Lesion. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 9, p. 7751–7759, 2004.

VAN LOON, Barbara; SAMSON, Leona D. Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) localizes to mitochondria and interacts with mitochondrial single-stranded binding protein (mtSSB). *DNA Repair*, 2013.

VERNER, Zdeněk *et al.* Malleable Mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 315, p. 73–151, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644814000094>>.

Acesso em: 2 maio 2017.

VESELA, Eva *et al.* Common chemical inductors of replication stress: Focus on cell-based studies. *Biomolecules*, v. 7, n. 1, 2017.

VIEIRA, Helaine Grazielle Santos *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* response to ionizing radiation stress. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e97526, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026238&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 maio 2014.

WALMACQ, Celine *et al.* Mechanism of Translesion Transcription by RNA Polymerase II and Its Role in Cellular Resistance to DNA Damage. *Molecular Cell*, v. 46, n. 1, p. 18–29, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.006>>.

WANG, Dong; LIPPARD, Stephen J. *Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nature Reviews Drug Discovery*. [S.l: s.n.], 2005

WANG, Jianyang *et al.* TbKAP6, a mitochondrial HMG box-containing protein in *Trypanosoma brucei*, Is the first trypanosomatid kinetoplast-associated protein essential for kinetoplast DNA replication and maintenance. *Eukaryotic Cell*, v. 13, n. 7, p. 919–932, 2014.

WANG, Shao Win *et al.* Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 1999.

WEBSTER, Keith A. *Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: Roles of calcium and reactive oxygen species. Future Cardiology*. [S.l: s.n.], 2012

WHO, World Health Organization. *Media Center: Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

WILKINSON, Shane R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 11, p. 8220–8225, 2000.

WILSON, David M.; BOHR, Vilhelm A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair*, 2007.

WISNOVSKY, Simon; JEAN, Sae Rin; KELLEY, Shana O. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. *Nature Chemical Biology*, v. 12, n. 7, p. 567–573, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nchembio.2102>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27239789>>.

WONG, Alexander K.C. *et al.* RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 51, p. 31941–31944, 1997.

XU, C W *et al.* Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 16, n. 2, p. 564–576, 1996.

YONETANI, Yasukazu *et al.* Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. 14, p. 4544–4552, 2005.

ZHANG, Rui; WANG, Jun. HuR stabilizes TFAM mRNA in an ATM/p38-dependent manner in ionizing irradiated cancer cells. *Cancer Science*, 2018.

ZHAO, Linlin; TODD WASHINGTON, M. Translesion synthesis: Insights into the selection and switching of DNA polymerases. *Genes*, v. 8, n. 1, p. 1–25, 2017.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000700021>.

ZINGALES, Bianca *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240–253, mar. 2012.

ZUMA, Aline Araujo *et al.* Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding

drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n. 5, p. 449–456, maio 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.031>>. Acesso em: 28 mar. 2012.

ZUMA, Aline Araujo *et al.* Unveiling the effects of berenil, a DNA-binding drug, on *Trypanosoma cruzi*: implications for kDNA ultrastructure and replication. *Parasitology Research*, v. 114, n. 2, p. 419–430, 2014.

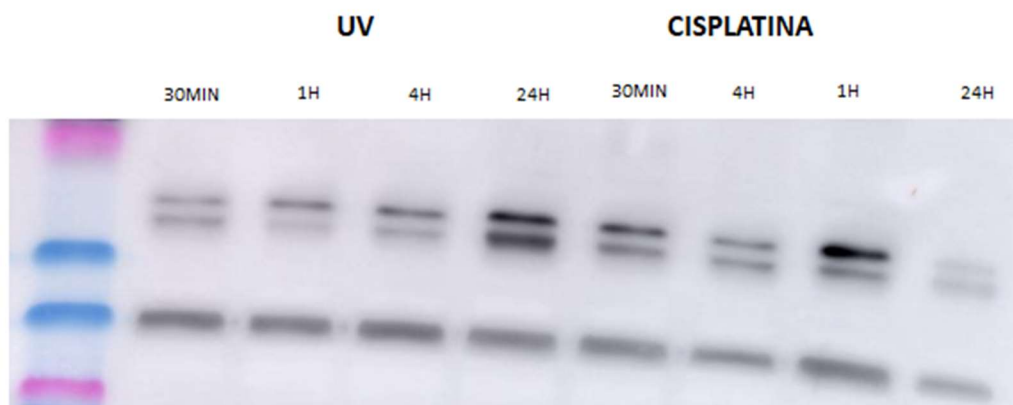
8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Imagens originais do *Western blotting* de extratos de *T. cruzi* após tratamento genotóxico

α TcKAP7



α Alfa-Tubulina

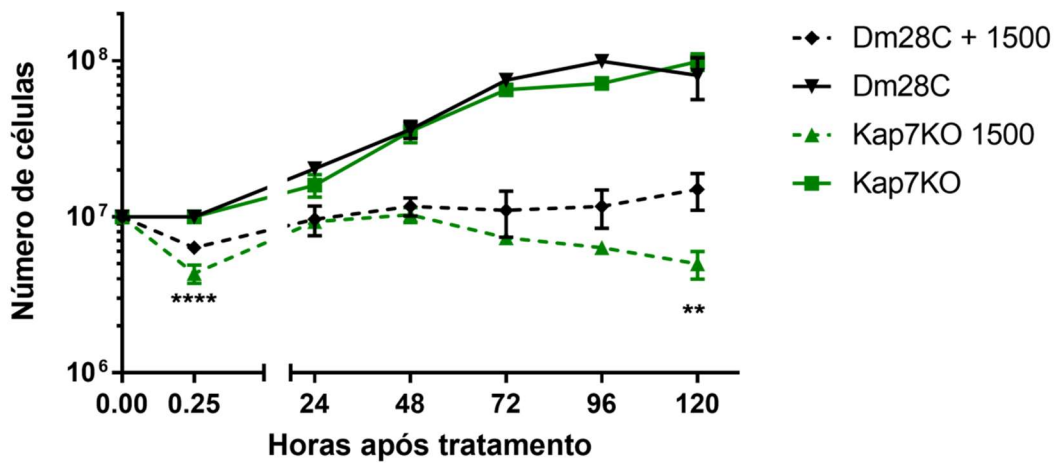


Anexo 1 – Imagens originais das membranas utilizadas para o cálculo do nível de expressão de TcKAP7 - As imagens apresentam os originais das imagens obtidas das membranas após a detecção de TcKAP7 (painel superior) e Alfa-tubulina (painel inferior) por *Western blot*.

8.2. Anexo 2 – Curvas de crescimento dos ensaios usados nos ensaios de Anexina e iodeto de propídeo

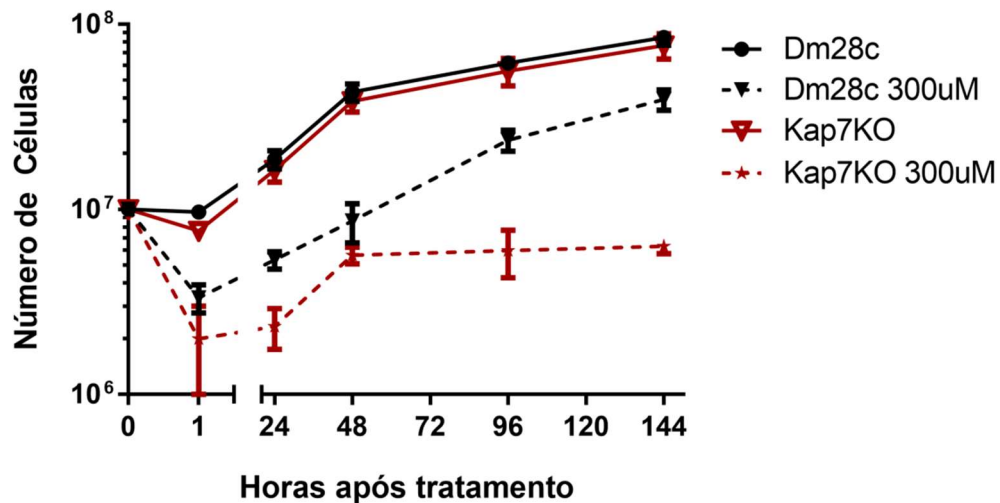
A)

Radiação Ultravioleta



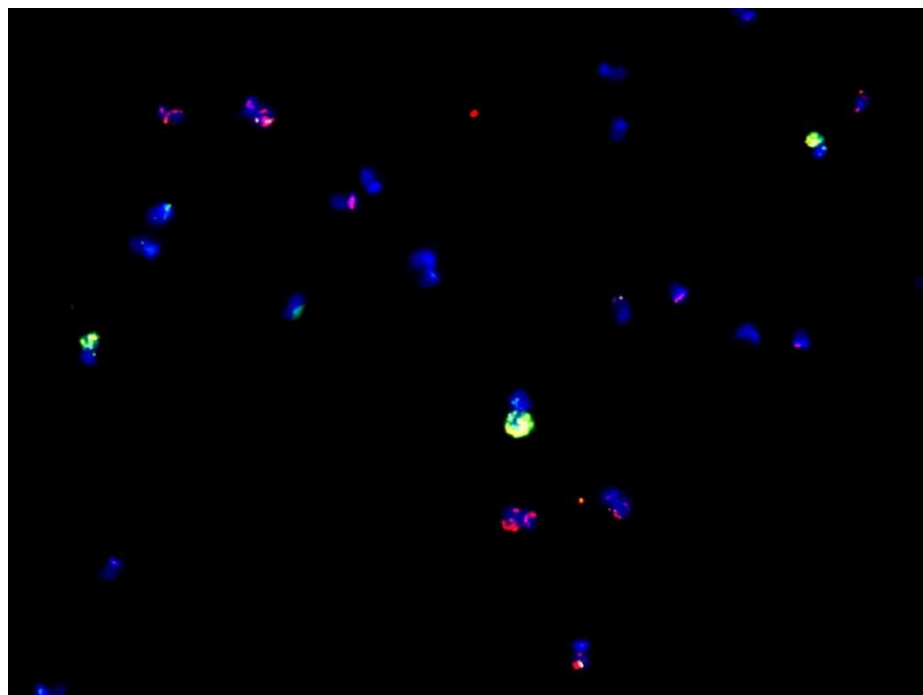
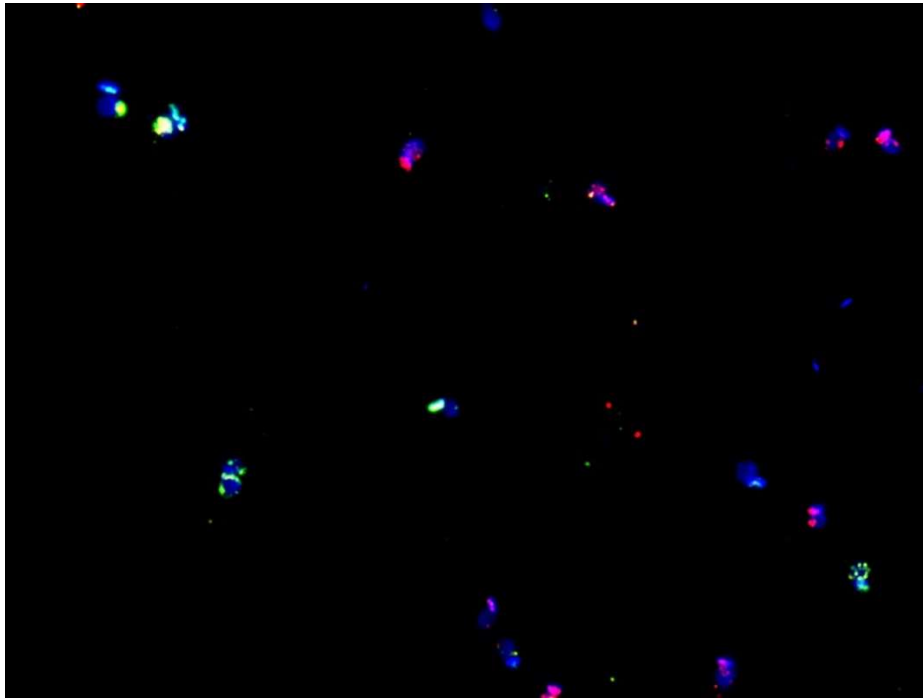
B)

Cisplatina



Anexo 2 – Curvas de crescimento das células tratadas e utilizadas nos ensaios de anexina V e iodeto de propídeo – A) Curva de crescimento de células nocautes e selvagens para TcKAP7 após exposição, como explicado anteriormente, à radiação UV. B) Curva de crescimento de células nocaute e selvagem para TcKAP7 expostas à cisplatina, como explicado anteriormente.


8.3. Anexo 3 – Imagens representativas de campos observados nos ensaios de ADEXTa



Anexo 3 – Imagens representativas de dois campos distintos de células epimastigotas de *T. cruzi* após o ensaio de incorporação de análogos de timidina e hibridização – As duas imagens são de campos distintos de um tratamento e um ensaio de hibridização demonstrando o resultado do experimento na cepa CI Brener. Importante notar a presença de células híbridas (amarelas) e células que apresentam ou incorporação de um dos análogos (verdes ou vermelhas).


8.4. Anexo 4 – Artigos científicos publicados durante o período de desenvolvimento da tese

1. Characterization of *Trypanosoma cruzi* MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response

Marianna Kunrath-Lima, **Bruno Marçal Repolês**, Ceres Luciana Alves, Carolina Furtado, Matheus Andrade Rajão, Andrea Mara Macedo, Glória Regina Franco, Sérgio Danilo Junho Pena, Lucía Valenzuela, Simon Wisnovsky, Shana O. Kelley, Norbel Galanti, Gonzalo Cabrera, Carlos Renato Machado, 


Infection, Genetics and Evolution, Volume 55, 2017, Pages 332-342, ISSN 1567-1348,

2. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*

Alves CL, **Repolês BM**, da Silva MS, Mendes IC, Marin PA, Aguiar PHN, Santos S da S, Franco GR, Macedo AM, Machado CR et al. 


Scientific Reports 8:1–12. doi: 10.1038/s41598-018-31541-z

3. Assessment of genetic mutation frequency induced by oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*

Torres-Silva, Carolina Furtado, **Repolês, Bruno Marçal**, Ornelas, Hugo Oliveira, Macedo, Andréa Mara, Franco, Glória Regina, Junho Pena, Sérgio Danilo, Tahara, Erich Birelli, & Machado, Carlos Renato. 

Genetics and Molecular Biology, 41(2), 466-474. Epub June 11, 2018. doi: 0.1590/1678-4685-gmb-2017-0281

4. The in vivo and in vitro roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions

Gomes Passos Silva D, da Silva Santos S, Nardelli SC, Mendes IC, Freire ACG, **Repolês BM**, et al. 

PLoS Neglected Tropical Diseases - 12(11): e0006875. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875>

**5. Analysis of DNA Exchange Using Thymidine Analogs (ADExTA) in
*Trypanosoma cruzi***

da Silva M, Marin P, **Repolês B**, Elias M and Machado C 