

PAULA ANDREA MARÍN MUÑOZ

**Análise dos mecanismos de *checkpoint* e reparo de DNA
em *Trypanosoma brucei* em resposta a quebras de DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

PAULA ANDREA MARÍN MUÑOZ

**Análise dos mecanismos de *checkpoint* e reparo de DNA
em *Trypanosoma brucei* em resposta a quebras de DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Dra. Maria Carolina Quartim
Barbosa Elias Sabbaga

Co-orientador: Dr. Marcelo Santos da Silva

Versão Original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marín Muñoz, Paula Andrea

Análise dos mecanismos de checkpoint e reparo de DNA em *Trypanosoma brucei* em resposta a quebras de DNA / Paula Andrea Marín Muñoz; orientador Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga; coorientador Marcelo Santos da Silva. -- São Paulo, 2019.

114 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Trypanosoma brucei*. 2. Checkpoint intra-S. 3. Ciclo celular. 4. Recombinação Homóloga. 5. Quebra de dupla fita de DNA. I. Quartim Barbosa Elias Sabbaga, Maria Carolina, orientador. II. Santos da Silva, Marcelo, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paula Andrea Marín Muñoz

Título da Dissertação/Tese: Análise dos mecanismos de *checkpoint* e reparo de DNA em *Trypanosoma brucei* em resposta a quebras de DNA.

Orientador: Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

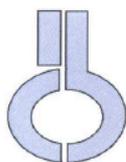
() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **703/14** referente ao projeto intitulado: “*Análise de origens de replicação em diferentes momentos da fase S e frente ao estresse replicativo em trypanosoma brucei*” sob a responsabilidade de **Paula Andrea Marín Munõz**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 13 de novembro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEPESH.004.2016

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção **CEP-ICB nº 703/2014**, de 13/11/2014, e por solicitação da Profa. Dra. *Maria Carolina Elias-Sabbaga*, do Instituto Butantan, informo que o título do projeto da aluna *Paula Andrea Marin Munoz* foi alterado para "**Análise do mecanismo de checkpoint e reparo de DNA em *Trypanosoma brucei* em resposta a quebras de DNA**" sendo que os objetivos do projeto também foram reformulados em função da obtenção de importantes resultados durante a pesquisa.

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **PAOLO MARINHO DE ANDRADE ZANOTTO**
Coordenador da CEPESH-ICB/USP

Prof. Dr. **ANDERSON DE SÁ NUNES**
Coordenador da CEUA-ICB/USP

Ao meu noivo Duván, melhor amigo e companheiro da viagem

Aos meus pais Luz Mery e Hernán Dario

Ao meu irmão Hernán Andrés

À minha amada família paterna e materna

São a minha motivação do dia a dia, representam o amor de Deus na minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela guia, sustento e intuição sempre.

Á minha família toda, pelo apoio e o amor incondicional. Na distância foram a minha força.

Ao Duván, pelo convite, sem você este capítulo não teria se escrito na minha vida. Aqui aprendi que mais que namorados, somos bons amigos e isso, meu amor, faz toda a diferença. Te amo.

A Mariana Moraes e a Regiane Braz, por se tornar meu “hogar” em São Paulo e me acolher nos seus corações. Amo muito.

A Ana Milena e ao Juan David por se tornarem os meus irmãos adotivos.

Á minha orientadora Dra. Maria Carolina Elias pela oportunidade, pela sua orientação em todo momento e por ter me ensinado o que é ser uma cientista integral. Foi uma honra conhecê-la e fazer parte da sua equipe.

Aos meus colegas do LECC, especialmente ao Marcelo, Raphael e a Marcela pelo conhecimento que compartilharam comigo, a paciência infinita o companheirismo e o carinho quando precisei. Aprendi muito com todos vocês. Vou sentir a sua falta.

Ao Fabio Montoni, o que eu posso dizer que não tenha dito, meu melhor amigo do lab. Vou sentir falta dos nossos cafés e do desabafo. A sua mão estive quando precisei e isso é inestimável e inesquecível. Gratidão cara.

Ao LETA e LECC, colaboradores, auxiliares e técnicos pela entrega e o trabalho tão importante que fazem e que possibilita as nossas atividades diárias.

Ao ICB e a USP pelo conhecimento e a Silvia Camargo pela paciência e ajuda desde o primeiro dia. Levarei você para a vida toda, querida.

A CNPq (140206/2015-9) pelo apoio financeiro, ao estado Brasileiro pela oportunidade e ao seu povo pela hospitalidade. São a minha segunda pátria, são os meus irmãos.

A Colciencias (756-2016), pelo apoio financeiro nos últimos anos.

A todos os que deixei de mencionar e que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

RESUMO

MARIN, P. A. “Análise dos mecanismos de *checkpoint* e reparo de DNA em *Trypanosoma brucei* em resposta a quebras de DNA”. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A tripanossomíase humana africana (HAT) é uma doença transmitida pela mosca tsé-tsé infectada com parasitas da espécie *Trypanosoma brucei*. Embora na atualidade essa doença seja considerada como um problema de saúde pública, não existe nem vacina nem uma droga recomendada disponível para prevenir a HAT. Assim, o controle do vetor e o tratamento dos pacientes são as únicas ferramentas disponíveis para combater esta doença. O tratamento com drogas de primeira linha, para as fases aguda e crônica da doença, incluem a quimioterapia com agentes que geram efeitos colaterais graves, como a suramina, pentamidina, melarsoprol e eflornitina. Recentemente, uma abordagem alternativa no tratamento da HAT inclui considerar o parasita *T. brucei* como uma “célula tumoral do sangue”, já que este compartilha com as células cancerígenas do sangue algumas propriedades como: a natureza eucariótica, o nicho na corrente sanguínea e a alta taxa de proliferação. Tais características devem permitir modelar o tratamento da HAT mediante o uso de ferramentas que incluam o emprego rotineiro de inibidores dos mecanismos de controle do ciclo celular. Neste sentido, a compreensão dos mecanismos envolvidos no controle do ciclo celular do parasita pode contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento de terapias anti-tripanosomas. Neste trabalho nós analisamos os mecanismos moleculares envolvidos no processo de *checkpoint* e reparo de DNA do *T. brucei* em resposta a quebras de dupla fita de DNA (DSBs). Após tratamento com IR, o *T. brucei* ativa pontos de *checkpoint* para interromper o ciclo celular coordenados pelas quinases tripanosomais PI3KKs (Principalmente ATM e ATR). Essa resposta é dependente da fase do ciclo celular do parasita durante o dano. Após DSBs, ATM mostrou ter um papel principal controlando a transição G1-S e *intra-S* do ciclo celular, enquanto a ATR exibe funções essenciais no *checkpoint intra-S*, bem como na passagem dos parasitas nas fases G2-M após dano e um papel discreto na passagem pela transição G1-S. Também foi observado que durante as fases *lateS/G2*, após danos no DNA, o marcador de cromatina gH2A é fosforilado enquanto a maquinaria HR é sequencialmente recrutada para o DNA, desencadeando o reparo das DSBs via RAD51 em aproximadamente 6 h, sob a regulação da quinase ATR. Nossos dados

sugerem que esse mecanismo foi ausente nas fases *G1/earlyS* onde nós sugerimos um mecanismo independente das proteínas da via HR atuando no conserto das DSBs que leva mais de 6 h para ocorrer. Finalmente, nós mostramos que a pentamidina, droga de primeira linha usada no tratamento da HAT aguda, gera quebras de DNA e ativa uma via que fosforila o marcador de DSBs, γ H2A. Usando inibidores das quinases ATM e/ou ATR nós observamos a sensibilização dos parasitas frente a droga evidenciada pela maior detecção de DSB. Juntos, esses dados mostram que o conhecimento do ciclo celular em tripanossomas, bem como do modo de ação de drogas, pode levar ao desenvolvimento de terapias combinatórias que devem auxiliar no controle das doenças causadas por estes parasitas.

Palavras-chave: Ciclo celular. Quebras de dupla fita de DNA. *Checkpoint intra-S*. Recombinação homologa. Pentamidina. *Trypanosoma brucei*.

ABSTRACT

MARÍN, P. A. "Analysis of checkpoint and DNA repair mechanisms in *Trypanosoma brucei* in response to DNA breaks". Thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Human African Trypanosomiasis (HAT) is a disease transmitted by the tsetse fly infected with parasites of the species *Trypanosoma brucei*. Although this disease is currently considered as a public health problem, there is neither a vaccine nor a drug available to prevent HAT. Therefore, the control of the vector and the treatment of patients are the only tools available to combat this disease. When untreated, the disease can be lethal leading to death within a few months. Treatment with first-line drugs, for the acute and chronic phases of the disease, includes chemotherapy with agents that generate serious side effects, such as suramin, pentamidine, melarsoprol, and eflornithine. Recently, an alternative approach in the treatment of HAT includes considering the parasite *T. brucei* as a "blood tumor cell", since it shares some properties with blood cancer cells, such as the eukaryotic nature, the niche in the bloodstream and a high proliferation rate. These properties should allow modeling the treatment of HAT by using tools including routine usage of inhibitors against the control mechanism of the cell cycle. In this sense, the understanding of the mechanisms involved in the control of the parasite cell cycle can contribute significantly to the development of anti-trypanosomes therapies. In this work, we analyzed the molecular mechanisms involved in the process of checkpoint and DNA repair of *T. brucei* in response to double DNA strand-breaks (DSBs). After ionizing radiation (IR) treatment, *T. brucei* activates checkpoint pathways coordinated by the tripanosomal PI3KKs kinases (especially ATM and ATR). This response is dependent on the cell cycle phases of the parasite during the DNA damage. After DSBs, ATM showed to have a main role controlling the G1/S and intra-S transition of the cell cycle, while ATR exhibits essential functions at intra-S checkpoint, as well as in the passage of parasites into G2/M phases after damage, but discrete role in G1/S transition. Additionally, during the late S/G2 phases, after DNA damage, the gH2A chromatin marker is phosphorylated and the homologous recombination (HR) machinery is sequentially recruited for DNA, triggering the repair of the DSBs via RAD51 in approximately 6 h, under the regulation of the ATR kinase. Our results suggest that this mechanism is absent in the G1/early S phases and our hypothesis is that an HR-independent mechanism acts in the repair

of DSBs taking more than 6 h to be completed. Finally, we showed that Pentamidine, a first-line drug used in the treatment of acute HAT, generates DNA breaks and activates a signaling pathway that phosphorylates gH2A. Using ATM and/or ATR kinase inhibitors, we observed the sensitization of parasites against the drug, evidenced by the greater detection of DSBs. Together, these data show that the knowledge of the cell cycle in trypanosomes, as well as the mode of action of drugs, can lead to the development of combined therapies that should assist in the control of diseases caused by these parasites.

Key-words: Cell cycle. Double stranded breaks DNA. Intra-S checkpoint. Homologous recombination. Pentamidine. *Trypanosoma brucei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Diagrama representativo da distribuição das espécies de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> e <i>Trypanosoma brucei rodhesiense</i> na África subsahariana.....	19
Figura 1.2- Modelo de controle do ciclo celular mediado por ciclinas.....	22
Figura 1.3- Mecanismos transcricionais e não transcricionais que impedem a entrada na fase S na presença de danos no DNA.....	25
Figura 1.4- Ponto de <i>checkpoint</i> Intra-S.....	27
Figura 1.5- Ponto de <i>checkpoint</i> G2-M.....	29
Figura 1.6- A ativação da ATM promove uma cascata de sinalização na cromatina danificada.....	30
Figura 1.7- Reparo de DSBs DNA pela via NHEJ, canônica e alternativa.....	31
Figura 1.8- Reparo de DSBs DNA pela via de recombinação homóloga.....	32
Figura 1.9- Representação dos principais morfotipos do <i>T. brucei</i> durante seu ciclo de vida.....	34
Figura 1.10- Valores estimados para a duração do ciclo de <i>T. brucei</i>	36
Figura 3.1- Esquema mostrando as marcações de terminais quebrados de DNA pelo TUNEL.	41
Figura 3.2- Ensaio de fracionamento e análise da cinética de reparo de DNA por western blot.....	44
Figura 3.3- Avaliação do ciclo celular de <i>T. brucei PCF</i> pela co-deteção de análogos de timidina.	46
Figura 3.4- Análise dos efeitos das quebras de DNA na dinâmica da replicação mediante o DNA combing.	48
Figura 4.1- Reversibilidade celular após o tratamento com IR.	55
Figura 4.2- Deteção de fragmentação de DNA e fosforilação da variante da histona H2A após IR.....	56
Figura 4.3- A expressão da proteína de replicação A (RPA1) aumenta após o tratamento com IR.....	58
Figura 4.4- Expressão, purificação e anti-soro gerado contra rTbExo1.....	59
Figura 4.5- Proteínas de reparo de recombinação homóloga (HR) no extrato proteico total após IR.....	60

Figura 4.6- Controle do ensaio de extração fracionada de proteínas.	61
Figura 4.7- Ensaio de fracionamento e análise de WB de bandas de RPA1 após IR.	62
Figura 4.8- Recrutamento de proteínas de reparo da via de recombinação homóloga (HR) para o DNA após IR.	63
Figura 4.9- Efeitos da resposta ao tratamento com IR no ciclo celular.....	64
Figura 4.10- Modelo para a cinética de recrutamento de proteínas de reparo de HR após IR.....	66
Figura 4.11- Reversibilidade celular após o tratamento com inibidores das quinases ATM e ATR	68
Figura 4.12- A co-deteção de análogos da timidina é específica.	69
Figura 4.13- Avaliação do ciclo celular de <i>T. brucei</i> mediante a co-deteção de análogos de timidina	70
Figura 4.14- Controle da transição das fases do ciclo celular após IR	71
Figura 4.15- Papel da ATM no controle da transição das fases do ciclo celular após IR	72
Figura 4.16- Papel da ATR no controle da transição das fases do ciclo celular após IR.....	73
Figura 4.17- Avaliação do <i>checkpoint</i> intra-S em células <i>T. brucei</i> ATR/RNAi mediante a co-deteção de análogos de timidina.....	75
Figura 4.18- Análise de conteúdo de DNA de <i>T. brucei</i> PCF após IR na presença de inibidores da atividade quinase	76
Figura 4.19- A cooperação entre PI3Ks regula o crescimento celular no <i>T. brucei</i> em resposta a DSBs gerados pela IR.....	77
Figura 4.20- Esquema representativo do ensaio de DNA combing para avaliar o empacamento das forquilhas de replicação após IR	78
Figura 4.21- Fator de alongamento de forquilhas de replicação (DFEF) em <i>T. brucei</i> após IR.....	79
Figura 4.22- DNA combing revela empacamento das forquilhas de replicação de DNA e a sua recuperação dependente da ATR após IR.....	81
Figura 4.23- Velocidade das forquilhas de replicação em parasitas wild type e com a expressão da ATR silenciada.	82
Figura 4.24- A fosforilação da histona H2A é desregulada na ausência da ATR após IR.....	83

Figura 4.25- A proteína de reparo RPA2 é desregulada na ausência da ATR após IR	84
Figura 4.26- A proteína de reparo RAD51 é desregulada na ausência da ATR após IR	85
Figura 4.27- Modelo da ativação de mecanismos de <i>checkpoint</i> e reparo de DNA no <i>T. brucei</i> PCF após tratamento com radiação ionizante	86
Figura 4.28- Curvas de proliferação das formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i> na presença de pentamidina	88
Figura 4.29- A Pentamidina gera quebras de dupla fita de DNA no <i>T. brucei</i> PCF..	89
Figura 4.30- A inibição de ATM e ATR potencia o efeito da pentamidina mediada por quebras persistentes de DNA não reparadas	90
Figura 4.31- A inibição da ATM e ATR sensibilizam o <i>T. brucei</i> PCF frente ao tratamento com pentamidina.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: *anaphase promoting complex*

ATM: *ataxia–telangiectasia-mutated*

ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*

ATRIP: *ATR-interacting protein*

bp: *base pair*

BRCA1: *Breast cancer type 1 susceptibility protein*

BSF: *Blood stream forms*

Cdc25: *Cell division cycle phosphatase*

CDC: *Cell Division Cycle*

CDK: *Cyclin Dependent Kinase*

Chk1: *Checkpoint kinase 1*

Chk2: *Checkpoint kinase 2*

CNS: *central nervous system*

CldU: *5-Chloro-2'-deoxyuridine thymidine analog*

CRK: *Cyclin Related Kinase*

CYCs: *Cycle cyclin orthologs proteins*

DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase*

DP1: *TFDP1 transcription factor 1*

E2F1: *E2F transcription factor 1*

FANC: *group of proteins associated with Fanconi anemia disorder*

FPC: *Fork protection complex*

HAT: *Human African trypanosomiasis*

HDAC: *Histona desacetilase*

HR: *Homologous recombination*

kDNA: *kinetoplast circular DNA*

MCM: *The minichromosome maintenance protein complex - DNA helicase*

MDC1: *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

Mdm2: *Mouse double minute 2 homolog, negative regulator of p53*

MMEJ: *Microhomology-mediated end joining*

MLL: *lysine methyltransferase*

MRN: *is a protein complex consisting of Mre11, Rad50 and Nbs1 in eukaryotes*

NHEJ: *Non-homologous end joining*

IdU: *5-Iodo-2'-deoxyuridine thymidine analog*

p21: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1 or CDK-interacting protein 1 (p21^{Cip1}/p21^{Waf1})*

p53: *Tumor protein p53 or tumor suppressor p53*

PCF: *Procyclic forms*

Plk1: *polo like kinase 1*

PI3KK: *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*

pRB: *The retinoblastoma tumor suppressor protein*

RAD51: *DNA repair protein RAD51 homolog 1*

RNF8: *E3 ubiquitin-protein ligase*

RPA: *Replication protein A*

Sae2: *Saccharomyces cerevisiae exonuclease 2*

SCF^{skp2}: *spk, cullin, F-box containing complex – ubiquitin ligase*

ssDNA: *Single stranded DNA*

TopBP1: *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*

UBC13: *E2 ubiquitin-conjugation enzyme 13*

VSG: *Variant Surface Glycoproteins*

Wee1: *Negative cell cycle regulator kinase*

XRCC2: *X-Ray Repair Cross Complementing 2 protein*

53BP1: *Tumor suppressor p53-binding protein 1 or p53-binding protein 1*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	<i>Ciclo celular eucarionte</i>	21
1.2	<i>Mecanismos que controlam o ciclo celular eucarionte</i>	21
1.2.1	<u><i>Entrada em G1 e Transição G1/S</i></u>	22
1.2.2	<u><i>Transição G2/M</i></u>	23
1.3	<i>Mecanismos de interrupção do ciclo celular ativada por danos</i>	23
1.3.1	<u><i>Checkpoint G1-S induzido por quebra de dupla fita de DNA</i></u>	24
1.3.2	<u><i>Checkpoint intra-S induzido por quebra de dupla fita</i></u>	26
1.3.3	<u><i>Checkpoint G2-M induzido por quebra de dupla fita de DNA</i></u>	29
1.4	<i>Reparo de quebras de dupla fita de DNA (DSBs)</i>	30
1.4.1	<u><i>Reparo de DSBs pela via de recombinação homóloga (HR)</i></u>	32
1.5	<i>Trypanosomas</i>	33
1.5.1	<u><i>Ciclo de vida e ciclo celular do Trypanosoma brucei</i></u>	34
1.5.2	<u><i>Mecanismos que controlam o ciclo celular em T. brucei</i></u>	35
1.5.3	<i>Mecanismos de interrupção do ciclo celular induzido por danos no DNA em Trypanosoma brucei</i>	37
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	<i>Cultura de Trypanosoma brucei</i>	40
3.2	<i>Tratamento com radiação ionizante e ensaio de viabilidade celular</i>	40
3.3	<i>Ensaio fluorimétrico de detecção de quebras no DNA (TUNEL)</i>	40
3.4	<i>Ensaio de imunofluorescência indireta (IIF)</i>	41
3.5	<i>Análise de conteúdo de DNA por citometria de fluxo</i>	42
3.6	<i>Expressão proteica, purificação e produção de anti-soro anti-TbExo1</i>	42
3.7	<i>Western blot de proteínas em extrato total e diferencial</i>	43
3.8	<i>Tratamento com inibidores de quinases e ensaio de viabilidade celular</i>	45
3.9	<i>Monitoramento do ciclo celular utilizando análogos de timidina</i>	45
3.10	<i>Ensaio de DNA combing</i>	47
3.11	<i>Extração de RNA total</i>	50
3.12	<i>rT-qPCR</i>	51

3.13	<i>Estimação da IC50 da Pentamidina e viabilidade celular</i>	51
3.14	<i>Tratamento combinado com inibidores de quinases, pentamidina e viabilidade celular</i>	52
4	RESULTADOS	53
	CAPÍTULO I	54
4.1	<i>Trypanosoma brucei</i> ativa a via de reparo por recombinação homóloga (HR) em resposta a quebras no DNA geradas pela exposição à radiação ionizante.....	54
4.1.1	<u>Impacto da radiação ionizante na sobrevivência de <i>T. brucei</i></u>	54
4.1.2	<u>A radiação ionizante gera fragmentação do DNA e a fosforilação da variante de histona H2A</u>	55
4.1.3	<u>A expressão da proteína de replicação A (RPA1) aumenta após o tratamento com IR</u>	57
4.1.4	<u>Algumas proteínas da via HR são up-reguladas após o tratamento com IR</u>	59
4.1.5	<u>A maquinaria de recombinação homóloga é rapidamente recrutada para o DNA após o tratamento com IR</u>	61
4.1.6	<u>As quebras no DNA induzidas pela radiação ionizante são reparadas eficientemente durante as fases lateS/G2 do ciclo celular</u>	63
4.1.7	<u>Considerações finais do Capítulo I</u>	65
	CAPÍTULO II	67
4.2	<i>As quinases ATM e ATR tem funções diferenciadas na resposta a danos gerados pela IR em <i>T. brucei</i></i>	67
4.2.1	<u>Efeitos dos inibidores de quinases na viabilidade celular do <i>T. brucei</i></u>	67
4.2.2	<u>Controle de transição das fases do ciclo celular mediadas pela ATM e ATR em resposta a DSB</u>	68
4.2.3	<u>A quinase ATM tem papel no controle da transição G1/S e intra-S em resposta a DSB</u>	72
4.2.4	<u>A quinase ATR tem papel no controle da transição intra-S em resposta a DSB</u>	73
4.2.5	<u>A quinase ATR tem papel no controle da saída de G2 em resposta a DSB</u>	75
4.2.6	<u>A cooperação entre PI3KK regula o crescimento celular em resposta a DSBs no <i>T. brucei</i></u>	77

<u>4.2.7 O empacamento de forquilhas, sua recuperação e o controle da velocidade da replicação são funções da ATR durante o checkpoint intra-S.....</u>	78
<u>4.2.8 A regulação de proteínas de reparo da via HR também é uma função da ATR.....</u>	82
<u>4.2.9 Considerações finais do Capítulo II.....</u>	85
CAPÍTULO III	87
<i>4.3 O bloqueio das quinases ATM e ATR sensibilizam o Trypanosoma brucei frente a ação da droga pentamidina.....</i>	<i>87</i>
<u>4.3.1 Busca do IC50 da pentamidina nas formas procíclicas do <i>T. brucei</i>.....</u>	<u>87</u>
<u>4.3.2 A pentamidina gera quebras no DNA e promove fosforilação da gH2A nas formas procíclicas do <i>T. brucei</i></u>	<u>88</u>
<u>4.3.3 A inibição de vias de <i>checkpoint</i> no <i>T. brucei</i> potencializa o efeito da pentamidina via DSBs persistentes.....</u>	<u>89</u>
<u>4.3.4 A inibição de ATM e ATR sensibiliza ao <i>T. brucei</i> frente a ação da pentamidina.....</u>	<u>91</u>
<u>4.3.5 Considerações finais do Capítulo III</u>	<u>92</u>
5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICES	112

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase humana africana (HAT), também conhecida como doença do sono, é uma doença parasitária transmitida por um vetor infectado com parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. A doença é transmitida ao hospedeiro humano pelas picadas da mosca tsé-tsé do gênero *Glossina* genus (1). Dependendo do parasita envolvido, a HAT pode assumir duas formas (Figura 1.1): i) a HAT rodesiana, que é causada pela espécie *Trypanosoma brucei rhodesiense* relatada em 12 países da África sul e oriental. Este tipo é a forma mais virulenta da doença, é zoonótica e rara. Esta forma representa menos de 3% dos casos notificados e, quando não tratada, as mortes dos pacientes ocorrem com frequência dentro de alguns meses (2); e ii) a HAT gâmbiana que é causada pela espécie *Trypanosoma brucei gambiense* relatada em 24 países da África ocidental e central. Atualmente, responde por 97% dos casos e apresenta longa latência e cronicidade, tornando-se o principal reservatório e agente de transmissão dentro do ciclo de vida do parasita (3-5).

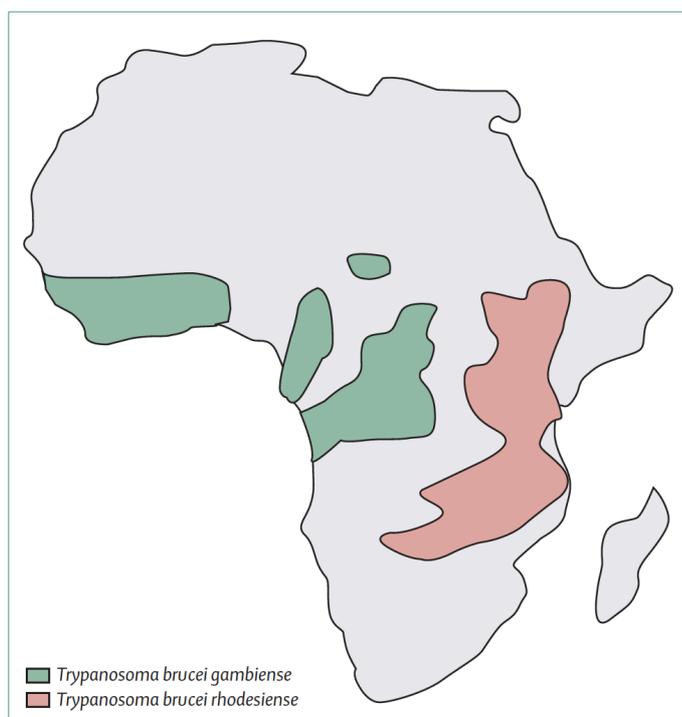


Figura 1.1- Diagrama representativo da distribuição das espécies de *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* na África sub-sahariana (6).

A doença HAT tem dois estágios clínicos: i) estágio sistêmico inicial hemolinfático e ii) a fase caracterizada pela invasão do cérebro por parasitas atingindo o sistema nervoso central (CNS). Esse estágio encefálico envolve distúrbios sensoriais, motores e psiquiátricos, com alterações do sono representando as manifestações mais típicas. Infelizmente, não existe nem vacina nem uma droga recomendada disponível para prevenir qualquer tripanossomíase africana (ocidental ou oriental) (7). Assim, o controle do vetor e o tratamento dos pacientes são as únicas ferramentas disponíveis para combater esta doença.

Ambas as formas de HAT são invariavelmente fatais sem intervenção quimioterapêutica. Até o momento, apenas quatro medicamentos, suramina, pentamidina, melarsoprol e eflornitina, são licenciados para o tratamento da HAT e a sua eficácia depende de a infecção ter atingido o estágio CNS ou permanecer no estágio inicial hemolinfático (8,9). O diagnóstico é frequentemente tardio, revelando infecção avançada por tripanossomas no CNS (10). Nestes casos, a eflornitina (em combinação com nifurtimox) é a terapia mais segura (11) e com maior disponibilidade nos últimos anos (12). No entanto, o altamente tóxico melaminofenil arsenical-melarsoprol ainda é usado pela falta de eficácia da eflornitina contra *T. b. rhodesiense* (13) e devido ao alto custo e a dificuldade da administração para uso contra *T. b. gambiense*. A HAT gambiana em estágio inicial é tratada com pentamidina, uma diamidina aromática. A pentamidina está em uso desde 1940 por meio de injeções intramusculares. Embora a pentamidina seja relativamente bem tolerada pela maioria dos pacientes, devido à sua toxicidade seletiva contra os parasitas, há alguns efeitos colaterais relatados, incluindo: hipotensão, hipoglicemia e nefrotoxicidade. Efeitos colaterais mais raros e graves também foram relatados, como funções pancreáticas e hepáticas altamente anormais e casos da síndrome de Stevens-Johnson potencialmente fatal (8).

O *T. brucei* compartilha com células cancerígenas algumas propriedades como a natureza eucariótica, o nicho na corrente sanguínea e a alta taxa de proliferação. O tratamento contra células tumorais emprega rotineiramente inibidores do ciclo celular, cujas ações exploram a taxa relativamente alta de divisão de células malignas, impactando diferencialmente as células neoplásicas dos tecidos do hospedeiro (14-16). Neste sentido, a compreensão dos mecanismos envolvidos no controle do ciclo celular de *T. brucei* pode contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento de terapias anti-tripanosomas.

1.1 *Ciclo celular eucarionte*

Numa célula eucarionte, a função mais básica do ciclo celular é duplicar a vasta quantidade de DNA nos cromossomos e então segregá-las precisamente em duas células filhas geneticamente idênticas. O ciclo celular é composto por quatro fases subsequentes: G1 (*Gap1*), S (Síntese de DNA), G2 (*Gap2*) e mitose (M) (17,18). Células diferenciadas estão geralmente em um estado sem divisão, conhecido como fase quiescente ou G0. As células quiescentes devem receber um sinal de crescimento para sair da fase G0 e re-entrar de novo no ciclo celular. A ligação de fatores externos como mitógenos nos seus receptores da superfície celular podem ativar as vias de sinalização, como por exemplo a proteína Ras/ativada por mitógeno, que desempenha um papel importante na entrada da célula na fase G1 (19-21).

1.2 *Mecanismos que controlam o ciclo celular eucarionte*

A progressão de uma célula no ciclo celular é regida pela ação de diferentes combinações de ciclinas-CDKs (*cyclin dependent kinase*). As CDKs são uma família de serina/treonina proteínas quinases que são ativadas em pontos específicos durante o ciclo celular. Existem cinco CDKs que foram associadas com a progressão do ciclo celular em células de mamíferos: CDKs 4 e 6, que estão ativas durante a fase inicial da fase G1; CDK2, ativa no final da fase G1 e S; CDK1, que é ativa durante as fases G2 e M; e CDK7, que atua em conjunto com ciclina H como uma quinase de ativação de CDK (CAK). A atividade das CDKs é altamente regulada e requer a expressão de ciclinas de ativação e a fosforilação do complexo ciclina-CDK. A expressão das CDKs permanece constante ao longo do ciclo celular, porém os níveis de ciclina aumentam e diminuem dependendo da fase do ciclo celular, permitindo que as ciclinas ativem periodicamente as CDKs (Figura 1.2) (22). A atividade completa das CDKs depende da expressão da ciclina específica e da ligação a CDK, bem como da fosforilação de CDK pelo complexo ciclina H-CDK7, também conhecido como o CAK. A fosforilação das CDKs por parte de CAK ocorre nos resíduos de treonina conservada e induz alterações conformacionais, que podem melhorar a ligação de ciclinas para regular ainda mais a atividade de CDKs. O ciclo celular também é controlado por reguladores negativos; estes inibem a atividade das CDKs e são referidos como inibidores da CDK, ou CKIs (22).

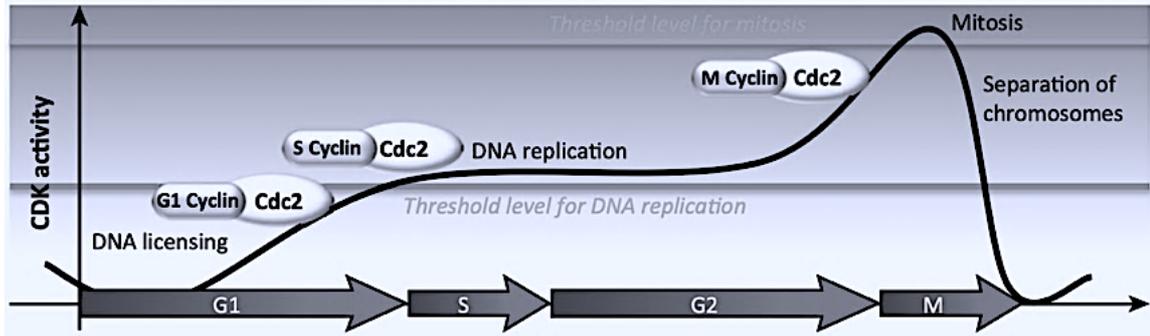


Figura 1.2- Modelo de controle do ciclo celular mediado por ciclinas. A atividade da quinase dependente da ciclina (CDK) é mostrada ao longo das diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M) (23).

1.2.1 Entrada em G1 e Transição G1/S

A progressão através da fase G1 do ciclo celular envolve uma regulação coordenada dos complexos ciclina-CDK e reguladores transicionais chaves. Nessa fase, as ciclinas tipo D são sintetizadas enquanto está presente o estímulo mitógeno ou fator de crescimento (24) e ligam-se a CDK4 e CDK6 que são necessárias pra entrar na fase G1 (25). A progressão inicial pela fase G1 é considerada dependente de mitógeno já que há uma exigência de estimulação mitogénica pra transcrição da ciclina D (25). Após a ativação do complexo ciclina D-CDK4/6, as CDKs induzem eventos de sinalização *down-stream* pela fosforilação de proteínas alvo que regulam a progressão do ciclo celular. O substrato mais importante desse complexo, e um dos mais estudados, é a proteína supressora de tumor do retinoblastoma (pRb), que é inativada pela fosforilação do complexo CDK4/6 - ciclina D (26).

No seu estado ativo, a pRb está em um complexo com a histona desacetilasa (HDAC) bloqueando o complexo formado pelos fatores de transcrição E2F1 e DP1. Durante a fase G1, a pRb é fosforilada pelo complexo ativado ciclina D1-CDK4/6, o que resulta na sua inativação e subsequente liberação dos fatores de transcrição E2F1 e DP1, que por sua vez ativam a transcrição de genes necessários para a progressão da fase S, incluindo os genes das ciclinas E e A e a fosfatase Cdc25 (26). E2F1 também regula a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos, como a dihidrofolato redutase, timidina quinase e timidilato sintetase (27). A pRb permanece hiperfosforilada durante o resto do ciclo celular, e o complexo E-CDK2 estabiliza este estado hiperfosforilado. Uma vez atingido o limiar

de fosforilação da pRb, os níveis de E2F1 são suficientes para promover a progressão da fase G1 pra S independente do estímulo do mitógeno. Portanto, a transição da dependência de mitógeno para independência é chamada de '*ponto de restrição*'. Na fase S, o complexo ciclina E-CDK2 requer a remoção de inibidores de fosforilação na CDK2 para atingir a atividade completa. A família Cdc25 fosfatases removem esses grupos fosfato nas moléculas de CDK, permitindo a ativação completa (28).

1.2.2 Transição G2/M

Para iniciar a entrada na mitose, é necessária a fosfatase Cdc25A para defosforilar a CDK1 e permitir a ativação do complexo ciclina B1-CDK1, desencadeando então a entrada na fase M (29). Uma vez ativada, a CDK1 fosforila seus próprios reguladores negativos e positivos, Wee1 e Cdc25A, respectivamente, para manter a adequada regulação. Em consequência, a fosforilação de Wee1 por CDK1 facilita o recrutamento de Plk1, que fosforila ainda mais o inibidor Wee1, levando à sua poli-ubiquitinação e degradação (30). Além disso, Plk1 fosforila a Cdc25A durante a mitose, o que facilita sua acumulação nuclear para aumentar a sua atividade em substratos essenciais. A Cdc25 é geralmente citoplasmática, mas transloca-se para o núcleo antes da fase (M). No entanto, quando Cdc25 está ligado as proteínas 14-3-3, o Cdc25 é sequestrado no citoplasma, o que o impede de ativar o complexo ciclina B-CDK1 (31). Todos estes eventos permitem a ativação máxima da ciclina B1 e assim promovem a progressão das células na mitose. Finalmente, o complexo APC (*anaphase promoting complex*) então degrada a ciclina B1 no final da mitose para garantir que a sua atividade seja perdida antes de uma nova entrada na fase G1 (28).

1.3 *Mecanismos de interrupção do ciclo celular ativada por danos no DNA*

Durante um ciclo de divisão celular típico de uma célula eucariótica são ativados uma série de mecanismos moleculares e vias de controle nomeados *checkpoint* que podem parar ou atrasar o ciclo celular diante de uma perturbação (28). Dependendo da fase do ciclo que é interrompida, os *checkpoints* são denominados *G1-S checkpoint*, *intra-S checkpoint* e *G2-M checkpoint*. Entre as causas de ativação de *checkpoint*, encontram-se os danos ao DNA gerados por mecanismos endógenos ou

exógenos. Em eucariotos superiores a ativação destes *checkpoints* está bem caracterizada e as diferentes vias de sinalização são governadas por proteínas do tipo fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3KKs) que funcionam coordenadamente em conjunto com os mecanismos de reparo de DNA. Entre as PI3KKs, encontram-se a *ataxia-telangiectasia-mutated* (ATM), a *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein* (ATR) e a *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) (28,32). As proteínas quinases PI3KKs são recrutadas por proteínas que detectam várias lesões no DNA. Uma vez recrutadas, as PI3KKs ativam uma cascata de eventos de fosforilação para suprimir a progressão do ciclo celular e promover a estrutura aberta da cromatina necessária para o reparo. Ainda, as PI3KKs podem promover a morte celular programada no contexto de danos excessivos no DNA (28). Os alvos *down-stream* das PI3KKs são as quinases de *checkpoint* Chk1 e Chk2. A ativação destas quinases depende da fase do ciclo celular e de como o dano é reconhecido. A ativação de Chk2 pode ocorrer durante todo o ciclo celular, enquanto a ativação da quinase Chk1 acontece principalmente em S e G2 (33).

Como esta tese trata de resposta a quebra de dupla fita de DNA, o texto a seguir vai abordar as vias de *checkpoint* ativadas neste contexto.

1.3.1 Checkpoint G1-S induzido por quebra de dupla fita de DNA

A célula possui mecanismos transcricionais e não transcricionais que impedem a entrada na fase S na presença de danos no DNA (Figura 1.3), principalmente na presença de quebras de dupla fita de DNA. Na fase G1, todas as vias de parada são iniciadas pela ativação da via da ATM (34). A ATM detém o ciclo celular através da fosforilação e ativação de Chk2 que exerce diretamente o controle sobre o ciclo celular modulando a ativação de CDKs. Durante o *checkpoint* G1-S, a quinase Chk2 fosforila Cdc25A, mediando sua degradação o que permite que os resíduos inibitórios na CDK2 permaneçam fosforilados, inibindo assim a transição para a fase S. Neste caso, a inibição da CDK2 depende inteiramente de modificações pós-translacionais e da via de degradação proteasomal (Figura 1.3A). Esta resposta é limitada pelo fato de que a via Chk2-Cdc25A só consegue inibir a ativação num ponto mais distante do '*ponto de restrição*' em G1. Experimentos mostraram que em células danificadas durante o final da fase G1, a inibição da progressão para a fase S não é forte, permitindo que as células entrem na fase S independentemente da ativação do *checkpoint*, o que resulta

no acúmulo de quebras de DNA nas fases subsequentes (35). Isso porque uma vez que as células passam do 'ponto de restrição' em G1, o fator de transcrição E2F1 inicia um *loop* de *feedback* positivo para ativar ainda mais o complexo ciclina E-CDK2, impulsando as células a prosseguirem na fase S (36). Células danificadas no início do G1, antes ou no 'ponto de restrição', conseguem ativar uma resposta de *checkpoint* mais forte. Tem sido demonstrado que essas células se movem mais lentamente na fase S do que as células danificadas no final do G1; no entanto, a capacidade de progredir pra fase S na presença de danos no DNA sugere em geral, uma resposta ineficiente do ponto de *checkpoint* G1-S, independentemente do ponto da fase G1 onde o dano tenha acontecido (28,35).

Além da modulação direta dos reguladores do ciclo celular, a modulação da progressão para a fase S conta também com uma resposta mais lenta que envolve fatores de transcrição. O fator de transcrição p53 e o seu regulador negativo Mdm2 são ambos fosforilados pela ATM (37). Além disso, o Chk2 fosforila ainda mais o p53.

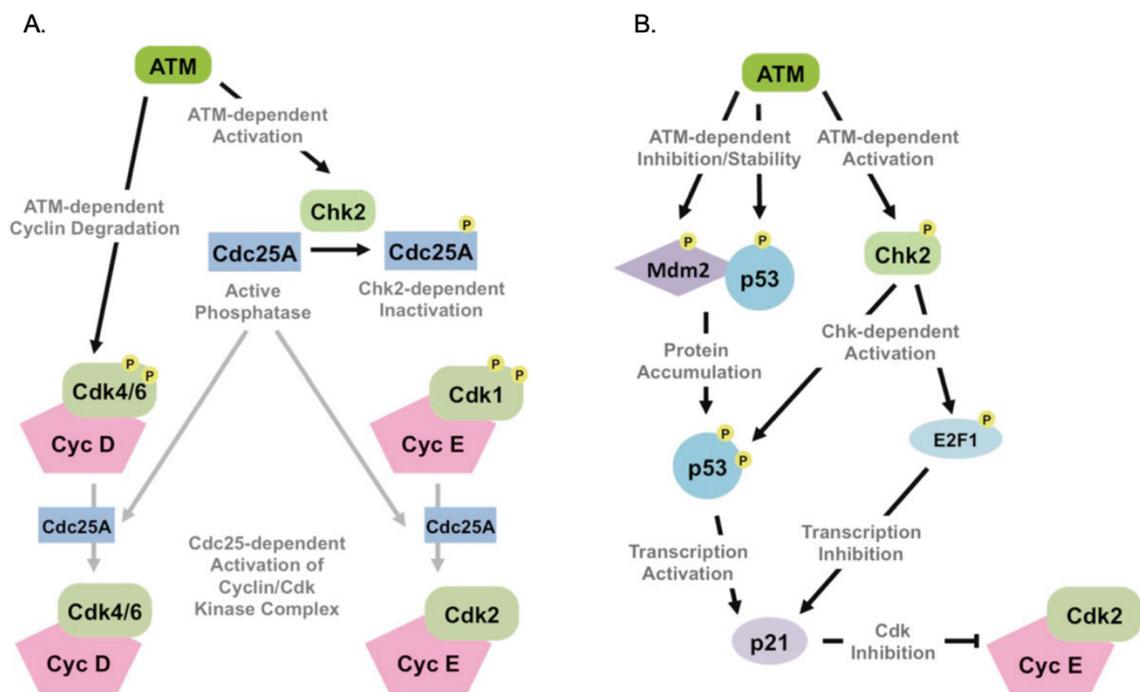


Figura 1.3- Mecanismos transcricionais e não transcricionais que impedem a entrada na fase S na presença de danos no DNA. (A) Parada em G1 independente da transcrição. A parada inicial da progressão em G1 é mediada pela modificação pós-traducional de Cdc25A por Chk2. (B) Parada em G1 dependente de transcrição. ATM indiretamente modula a regulação transcricional da progressão do ciclo celular através da modificação direta de fatores de transcrição, por exemplo, p53, ou Mdm2, ou indiretamente por meio da ativação da Chk2. A consequência *down-stream* desses eventos é a regulação de fatores como p21, que inibem a atividade da CDK2 (28).

Ambas as modificações estabilizam p53 através do bloqueio da degradação mediada por Mdm2 (38). A p53 ativa pode então regular transcricionalmente o inibidor de CDK, p21 (WAF1/CIP1), que inibe a entrada na fase S através da sua ligação aos complexos de ciclina E e D inibindo a suas atividades mediadas pelos CDKs (39). Devido à necessidade da maquinaria de transcrição ser ativada, a parada do ciclo celular mediada pelo p53 é um processo muito mais lento e provavelmente secundário aos processos não transcricionais, mas é essencial para a inibição completa da entrada na fase S (40-44).

1.3.2 Checkpoint intra-S induzido por quebra de dupla fita

Uma vez que a célula passa pelo G1 e entra na fase S, quebras no DNA podem interferir nos processos normais de replicação do DNA. Nesse caso o ponto de *checkpoint* intra-S pode funcionar em duas vias, diminuindo i) o disparo das origens de replicação tardias e ii) a parada do processo de alongamento das forquilhas de replicação, o que chamaremos de empacamento de forquilhas de replicação (45). A ATR é a principal quinase ativada durante o *checkpoint* intra-S. A via de sinalização canônica da ATR em eucariontes superiores sugere que, ao contrário da ATM, a ATR deve ser recrutada para o sítio da lesão do DNA para ser ativada.

O recrutamento da ATR no sítio da lesão acontece pela exposição de filamentos de simples fita de DNA (ssDNA) que recruta a proteína de ligação a DNA simples fita (ssDNA) RPA. O aumento de substratos ssDNA é uma consequência de: i) atividade helicase numa forquilha de replicação empacada ou ii) a ressecção do DNA dependente de ATM no contexto de quebras de dupla fita de DNA, o que fornece o sinal RPA-ssDNA para o recrutamento e ativação da ATR (46-52). Assim, um aumento de substratos ssDNA ligados a proteína RPA sinaliza pra o recrutamento da ATR através do seu fator de recrutamento ATRIP (47,53). Para a ativação de ATR, é necessário o recrutamento ainda do complexo 9-1-1, composto de Rad9 – Hus1 – Rad1, para o sítio de lesão e do recrutamento da topoisomerase TopBP1 que interage com ATRIP e facilita a ativação da ATR através da sua auto-fosforilação (46).

Uma vez ativada, ATR ativa seu substrato mais importante, a Chk1, fosforilando-o em dois principais resíduos de serina, S317 e S345. Chk1 age de forma semelhante ao Chk2 na parada do G1, suprimindo as atividades do complexo ciclina-CDK, pela

ação inibitória da Cdc25A, e inibindo o processo de replicação (54). Chk1 inibe o disparo das origens de replicação através da modificação nas funções do complexo helicase MCM e Cdc45. Este processo requer a diminuição da trimetilação da histona H3 na lisina 4 (H3K4me3), modificação conhecida por inibir a ligação do Cdc45, proteína essencial pra o início da replicação. Em resposta a danos no DNA, a enzima responsável pela modificação H3K4me3, a lisina metiltransferase MLL, é estabilizada através da fosforilação por ATR (Figura 1.4). Durante a fase S, a MLL é normalmente degradada pelo complexo SCF^{skp2} ubiquitina ligase, porém em resposta a estresse replicativo a ATR impede esta degradação mantendo então a modificação da H3K4me3 e, assim, inibindo a atividade do Cdc45 nas origens. Se, por um lado a ATR inibe a ativação de origens na presença de dano, por outro, quando as forquilhas de replicação empacam em regiões de danos no DNA, as origens dormentes nas proximidades são ativadas ajudando a promover a replicação do fragmento de DNA naquela região específica. Para isso, ATR fosforila a subunidade helicase MCM2 na origem dormente próxima a uma forquilha empacada (28).

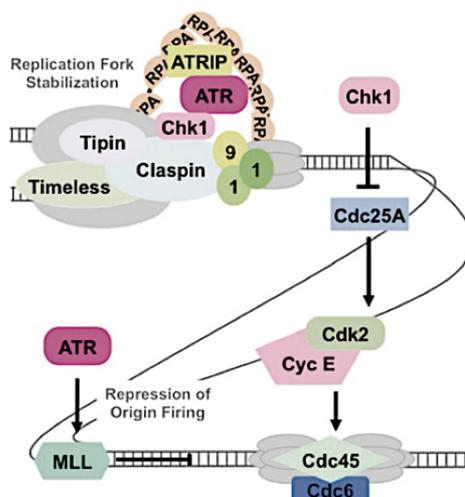


Figura 1.4- Ponto de *checkpoint* Intra-S. Evidências sugerem que a cascata ATR-Chk1 é ativada durante danos de DNA acontecendo na fase S e pode funcionar em duas vias. A ATR liga-se diretamente as forquilhas de replicação, promovendo a estabilização dos componentes da forquilha quando elas encontram uma lesão de DNA. A ATR pode funcionar distalmente suprimindo o disparo das origens tardias. Além disso, o Chk1 pode sinalizar diretamente para o complexo ciclina E–CDK2 da fase S para inibir o disparo das origens (28).

Além de impedir o disparo de origens na presença de lesão no DNA durante a fase S enquanto ativa localmente uma origem dormente, a via de *checkpoint* ATR estabiliza a maquinaria de replicação nas forquilhas empacadas. Esta estabilização

evita a geração de novos danos, pois a dissociação da maquinaria de replicação pode levar a inversão das forquilhas formando estruturas de DNA aberrantes que podem ser alvo de nucleases, levando a um aumento das lesões. A presença de ATR nas forquilhas estabilizadas pode também promover o recrutamento de polimerases de translesão (55).

Sabe-se que a ativação de ATR permite a estabilização da forquilha, em condições normais ou de estresse replicativo, da seguinte maneira: o complexo de estabilização de forquilhas (FPC) ajuda na coordenação das funções das proteínas helicase e da polimerase para garantir que as funções enzimáticas da maquinaria de replicação permaneçam ativas durante pequenas ou maiores paradas na replicação. A *Claspin*, uma proteína do complexo FPC, participa na regulação da velocidade de progressão da forquilha e participa também diretamente do recrutamento da Chk1. O recrutamento da Chk1 dependente de *Claspin* permite a sua associação com a ATR nas forquilhas de replicação e conseqüentemente facilita a sua ativação. *Timeless* e *Tipin* provavelmente participam na estabilização da *Claspin* ligada, além de manter a associação da DNA polimerase α (55).

Em resposta a danos de DNA, outros complexos suportam a via de sinalização ATR – Chk1. Um deles são os fatores da Fanconi Anemia de (FANC) que respondem a forquilhas de replicação que param ou entram em colapso. Um fator de entre os nove membros da família FANC, a FANCM localiza-se na forquilha de replicação para estabilizar e suportar o reparo e a replicação adequada em resposta a danos no DNA. Chk1 também participa da montagem e estabilização do fator FANCM (56).

Finalmente a liberação do *checkpoint* provavelmente ocorre de várias maneiras: i) A supressão da atividade da ATR pelo encurtamento dos trechos de filamentos ssDNA, e ii) A degradação proteasomal da *Claspin* que pode promover por sua vez a degradação da Chk1 (57,58). Neste cenário, o regulamento do sinal de fosforilação dependente da ATR deve ser muito rigoroso durante a fase S, a fim de manter a parada do ciclo celular pra permitir o reparo das lesões no DNA, mas ao mesmo tempo tem que ser reversível para prosseguir com a replicação do DNA e retomar rapidamente a progressão do ciclo celular (59-61).

1.3.3 Checkpoint G2-M induzido por quebra de dupla fita de DNA

A parada do ciclo celular durante G2 é essencial para evitar que células com lesões no DNA não resolvidas progridam para a mitose, onde as células são mais sensíveis a danos no DNA já que apresentam a maquinaria de reparo suprimida (28). Estudos sugerem que a parada do ciclo celular na fase G2 é infrequente e complexa e requer uma grande quantidade de quebras no DNA. Durante G2-M a Chk2 e Chk1 são ativadas pelos mesmos fatores que durante G1 e S (36,62). Na presença de quebras de dupla fita e assim como acontece nos *checkpoints* G1-S e intra-S, no *checkpoint* G2-M a ATM parece ser a primeira quinase ativada e fornece a ativação *down-stream* de Chk2 (62,63). A ativação da ATM acontece rapidamente, mas é incapaz de sustentar a parada do ciclo celular em G2 *per se*. A ATM e ATR contribuem para o estabelecimento e manutenção do *checkpoint* G2-M, em parte porque, como dito para o *checkpoint* intra-S, a ressecção do DNA dependente de ATM fornece o sinal RPA-ssDNA para o recrutamento e ativação da ATR. Esta ativação da ATR dependente de ATM é um exemplo de cooperação funcional importante entre as PI3KKs (Figura 1.5) (64,65).

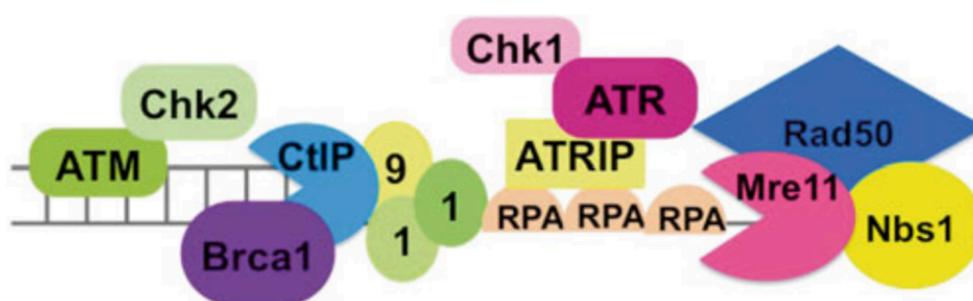


Figura 1.5- Ponto de *checkpoint* G2-M. Ambas as vias de sinalização ATM e ATR induzidas por dano podem funcionar durante a fase G2. Evidências sugerem que ATM atua principalmente para parar o ciclo celular na presença de quebras de dupla fita. Porém a supressão adicional do ciclo celular é mantida pela ativação *down-stream* da ATR-Chk1 na presença de intermediários de ssDNA processados pela maquinaria de reparo de DNA pela via de recombinação homóloga (HR). Por tanto a consequência da ativação das duas vias ATM/ATR e Chk2/Chk1 é a supressão completa da atividade do complexo ciclina B/Cdk1, necessária para entrar na fase M (28).

1.4 Reparo de quebras de dupla fita de DNA (DSBs)

As vias de sinalização de *checkpoint* dependentes de quinases descritas acima funcionam coordenadamente com os mecanismos de reparo de DNA frente a quebras no DNA nos modelos eucariontes. Em resposta aos diferentes tipos de danos no DNA as células desenvolveram múltiplos mecanismos de reparo especializados para cada tipo de lesão no DNA. Os eucariontes têm duas maquinarias de reparo principais para concertar as quebras de dupla fita de DNA e garantir a integridade genômica: a maquinaria de recombinação homóloga (HR) e a maquinaria para a junção de extremidades não homólogas (NHEJ). Embora esses mecanismos sejam mecanisticamente diferentes, a resposta inicial é comum e inclui a ativação da ATM. Em ambos os casos, as DSBs desencadeiam a fosforilação rápida de S139 na cauda do terminal C da variante de histona H2AX. Esta modificação, denominada gH2AX, é primariamente mediada pela ATM em resposta a DSBs e forma a base de uma cascata de sinalização baseada na cromatina (66) (Figura 1.6).

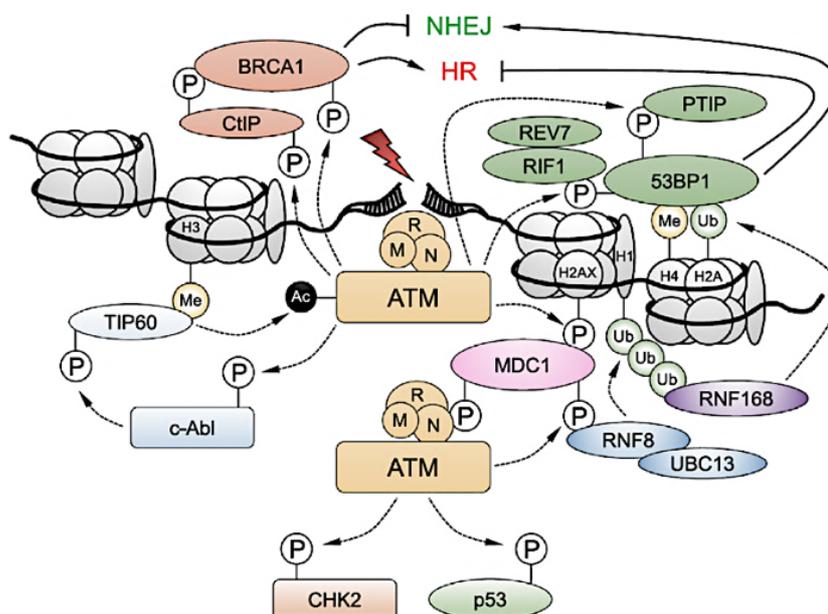


Figura 1.6- A ativação da ATM promove uma cascata de sinalização na cromatina danificada. ATM é recrutado e ativado pelo complexo MRN nos sítios DSBs. Em seguida a ATM fosforila a histona H2AX e MDC1 para ativar uma cascata de fosforilação e ubiquitinação mediada por RNF8 e RNF168 que resulta no recrutamento da 53BP1 e a ativação da via NHEJ. A ATM fosforila 53BP1 para promover o recrutamento de seus efetores, que são antagonizados pela BRCA1 e CtIP, também substratos da ATM e que favorecem a ativação da via HR (34).

O principal leitor da marca gH2AX é o mediador MDC1, que se liga especificamente a gH2AX nos sítios de DSB (67). Na cromatina, o MDC1 é estabilizado pela ATM, que fosforila MDC1 para promover a sua dimerização. Uma vez dimerizado, MDC1 é reconhecido pela subunidade NBS1 do complexo sensor MRN, o que promove a retenção do complexo MDC1-MRN na cromatina que contém a gH2AX (68,69). Um modelo atrativo é que o recrutamento do MRN pelo MDC1 leva a um maior recrutamento da ATM através da sua interação com o NBS1, levando a formação adicional de gH2AX, ao recrutamento MDC1-MRN-ATM, espalhando assim o complexo ao longo da cromatina amplificando a sinalização do *checkpoint*. Após o espalhamento nos locais DSB, a ATM fosforila MDC1 em motivos T-Q-X-F que são reconhecidos pela ubiquitina ligase RNF8, promovendo assim a retenção de RNF8 na cromatina danificada (70,71).

Dependendo da fase do ciclo celular, a quebra de dupla fita é reparada pelo processo de NHEJ ou HR. Isso porque o mecanismo de ressecção da via HR é dependente de ciclina B que só está expressa na fase G2/M do ciclo. Na ausência de ciclina B, o RNF8 junto com outra ligase de ubiquitina, a enzima de ubiquitina UBC13, promove o recrutamento da proteína do *scaffold* 53BP1 e esta vai direcionar o reparo da DSB para o NHEJ (Figura 1.7).

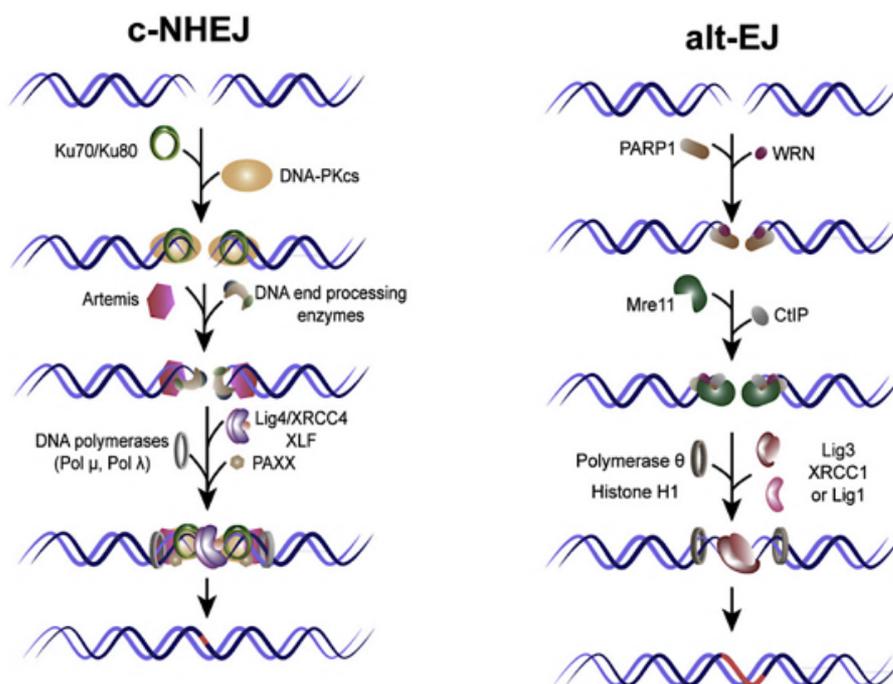


Figura 1.7- Reparo de DSBs DNA pela via NHEJ, canônica e alternativa (72).

A maquinaria NHEJ está disponível durante todas as fases do ciclo celular e é predominante durante a fase G1. O reparo acontece pela junção de extremidades de DNA não homólogas e é um processo sujeito a erros que pode gerar mutações e deleções (15). Uma via NHEJ alternativa denominada junção de terminais mediada por microhomologia (MMEJ), ou alt-EJ, tem sido descrita também no reparo de DSB, principalmente durante as fases G1 e S (72).

1.4.1 Reparo de DSBs pela via de recombinação homóloga (HR)

O processo de HR fica favorecido em relação ao NHEJ nas células em G2 devido a presença de ciclina B, como dito, e também porque a proteína BRCA1 desloca 53BP1 dos focos de DSB. O mecanismo de HR começa quando ATM ativada fosforila BRCA1 em múltiplos resíduos em resposta a danos no DNA. Quando a via de reparo HR é favorecida, o complexo MRN mantém os terminais de DNA próximos e é o responsável pelo primeiro processamento do DNA junto com outras endonucleasas (Figura 1.8). No caso da DSB gerada por radiação ionizante, os extremos gerados são irregulares e precisam de um processamento adicional por parte de exo e endonucleasas, que é dependente de ciclina B como comentado acima.

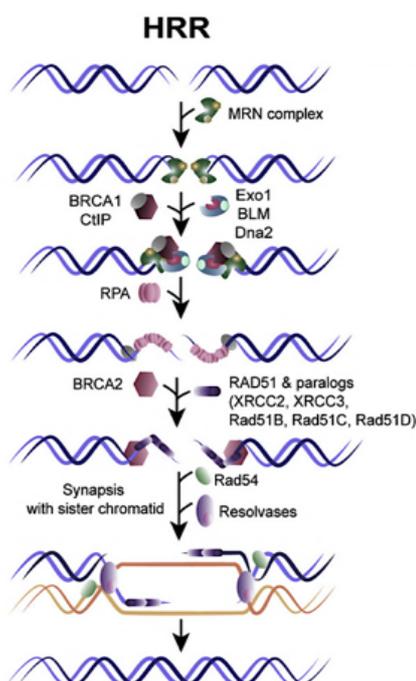


Figura 1.8- Reparo de DSBs DNA pela via de recombinação homóloga (HR) (72).

Após uma longa resseção do substrato 3'ssDNA pelas exonucleases Exo1 e Sae 2, a exposição de ssDNA recruta a proteína RPA e assim, como explicado, acontece o recrutamento do complexo ATRIP nos extremos de DNA. O reparo por recombinação homóloga acontece quando a proteína de recombinação RAD51 desloca a RPA ligada nos extremos ssDNA e auxilia na procura de sequências homólogas mediante o *screening* de cromossomos ou cromátides irmãs. Posterior ao *screening* ocorre à invasão das fitas homólogas de DNA que servirão como molde para que DNA polimerases sintetizem novo DNA, consertando completamente o dano com o mínimo de erros na informação genética original (73,74).

1.5 *Tripanossomas*

Na escala evolutiva os Tripanosomatídeos embarcaram no seu próprio ramo evolutivo dentro da linhagem eucarionte há mais de 500 milhões de anos antes da origem dos seus atuais hospedeiros invertebrados e vertebrados (75). Esses protozoários possuem algumas peculiaridades, tais como a transcrição polisstrônica, a edição de RNA e uma ampla variabilidade e plasticidade genômica, o que os tornam em modelos de estudo interessantes para se ter um pequeno vislumbre do processo evolutivo e das bases moleculares da patogênese.

Em nosso laboratório, as espécies *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* têm servido de modelo no estudo, tanto das maquinarias de pré-replicação e dinâmica da replicação, como, mais recentemente, das maquinarias de resposta a estresse replicativo e do controle do ciclo celular. Estes processos moleculares são de importante interesse na área, já que estudos tem mostrado que proteínas da maquinaria de replicação e resposta a danos no DNA auxiliam nos processos de diferenciação dos parasitas (76), assim como o controle da parada da replicação de DNA está associada com as formas infecciosas nas três espécies de tripanosomatídeos (77,78).

Além disso, foi relatado que o ciclo celular dos parasitas pode-se tornar uma ferramenta importante na melhora do desempenho dos fármacos que tem por alvo moléculas do metabolismo do DNA e o controle do ciclo celular (79), entre outras (80,81).

1.5.1 Ciclo de vida e ciclo celular do *Trypanosoma brucei*

Dentro do vetor, o parasita passa por transformações que o preparam para infectar o hospedeiro humano. Os parasitas no sangue dos mamíferos são ingeridos durante a refeição sanguínea e se transformam em células da forma procíclica (PCF) replicativa Figura 1.9 A [1]. Estes infestam o intestino médio, onde o ciclo celular é interrompido. Ali, as células mesocíclicas [2] se desenvolvem em grande número e migram para o pro ventrículo, onde a forma epimastigota longa e rápida [3] se desenvolve e se divide assimetricamente para produzir parasitas epimastigotas curtos [4], que, por sua vez, se diferenciam em células epimastigotas aderidas nas glândulas salivares [5]. As células metacíclicas, infecciosas e não replicativas [6] que se diferenciam nas glândulas salivares são finalmente expelidas pela mosca tsé-tsé e injetadas na pele de mamíferos durante a picada (82,83).

Após a picada e como pré-adaptação à sua vida em humanos, os parasitas metacíclicos começam a expressar Glicoproteínas Variantes de Superfície (VSG) (2). Uma vez que a forma metacíclica invade o hospedeiro humano, o parasita se desenvolve na forma da corrente sanguínea (BSF- formas alongadas do parasita com ciclo de vida assíncrono) onde se prolifera e se propaga na circulação Figura 1.9 (B).

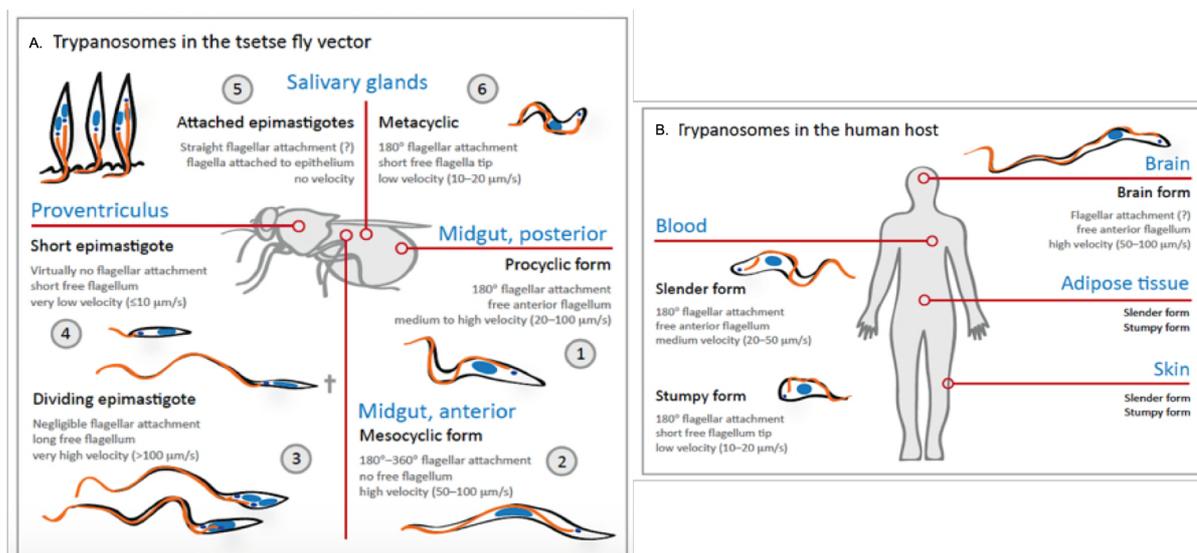


Figura 1.9- Representação dos principais morfotipos do *T. brucei* durante seu ciclo de vida. São representados seus nichos nos hospedeiros: na mosca tsé-tsé (A) e nos mamíferos (B) (83).

No curso da infecção, eles são capazes de infestar vários tecidos e órgãos, incluindo pele, tecido adiposo e cérebro, variando assim suas capacidades móveis.

Na alta parasitemia, o ciclo celular é interrompido e se formam células curtas de motilidade lerda (formas curtas do parasita com o ciclo celular síncrono) (83). Essas formas na fase do ciclo celular quiescente, são as formas infectivas não replicativas, que são transmitidas para o vetor recomeçando um outro ciclo de infecção (84).

1.5.2 Mecanismos que controlam o ciclo celular em *T. brucei*

O ciclo celular em tripanosomatídeos envolve alterações morfológicas que permitem que células em uma cultura exponencial sejam identificadas conforme a fase do ciclo celular em que se encontram. Nestas células o número de núcleos e de cinetoplastos (que contem o DNA de sua única mitocôndria) permite identificar em qual fase do ciclo a célula está. Quando as formas procíclicas de *T. brucei* estão em G1, as células apresentam 1N1K1F (N: núcleo, K: cinetoplasto, F: flagelo) e ao final desta fase ocorre o início da duplicação do DNA do cinetoplasto (kDNA). No início da fase S nuclear um novo flagelo surge. Na metade de S o kDNA termina de ser duplicado, desta forma células em S apresentam 1N1K2F, com cinetoplasto em divisão. A divisão do cinetoplasto termina em G2, assim células nesta fase apresentam 1N2K2F. Durante a mitose ocorre a segregação dos cromossomos e a formação do fuso mitótico e a divisão nuclear. Assim células que apresentam 2N2K2F já concluíram a mitose e seguirão para a citocinese (85,86).

A duração de cada fase do ciclo celular varia consideravelmente nos diferentes protozoários e parece ser específico da espécie, embora também dependa de muitos outros fatores, entre eles a linhagem do parasita e o meio de cultura (87). Tal como acontece com outros organismos, o cálculo das fases do ciclo celular em parasitas tripanosomatídeos depende de ensaios de proliferação que incluem o monitoramento dos seguintes eventos biológicos: replicação do DNA (fase S) e mitose (fase M). Um estudo recente de nosso grupo calculou com precisão a duração de cada fase do ciclo celular dos tripanosomatídeos, usando análogos de timidina e a marcação do DNA nuclear e do cinetoplasto (87).

Usando os padrões morfotipos N/K, o ciclo celular da forma procíclica do *T. brucei* tem uma duração de 8.5 h: sendo as fases G1 e S as mais longas com 3.4 h e 2.5 h, respectivamente. A fase G2 leva 1.05 h, em quanto que a mitose e a citocinese duram 0.7 h e 1.1 h respectivamente (Figura 1.10).

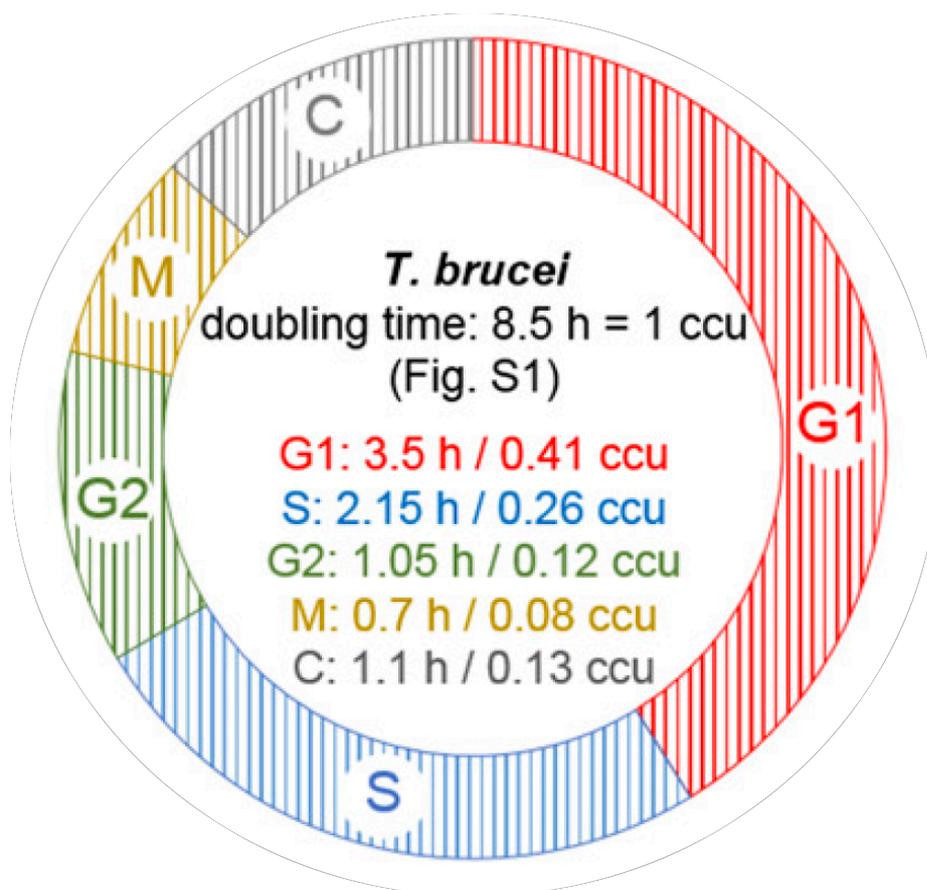


Figura 1.10- Valores estimados para a duração do ciclo de *T. brucei*. (87).

Para que os eventos biológicos que geram uma nova célula aconteçam durante esse período de tempo, as formas replicativas dos tripanossomas possuem um ciclo celular coordenado por enzimas e proteínas parecidas com as ciclinas-CDKs descritas em modelos eucariotas. Em *T. brucei* a caracterização do papel das CRKs (*cyclin related kinases*) e CYCs (*Cycle cyclin orthologs proteins*) está melhor esclarecida que para as outras espécies de tripanosomatídeos, porém muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que governa o tempo das fases do ciclo celular. No genoma do *T. brucei* foram encontradas 11 CRKs e 10 CYCs. Duas destas CRKs (1 e 2) e quatro CYCs (2,4,5 e 7) apresentam importante papel na transição das fases G1/S, na qual CRK1 é capaz de interagir com CYC2,4,5 e 7, enquanto CRK2 interage apenas com CYC2 (88-91). Na transição das fases G2/M as CRKs 3 e 9 e as CYCs 2,6 e 8 estão envolvidas. De forma que CRK 3 interage tanto com CYC2 e 6, enquanto CRK9 interage apenas com CYC2. O papel de CYC8 foi identificado em ensaios de RNA de interferência ocorrendo retardo na transição das fases G2/M, porém sua parceira CRK ainda não foi identificada (83,88,89,92). Também um trabalho recente

tem mostrado o papel da CYC6 (ortólogo da ciclina B) na montagem do fuso bipolar e como os tripanossomas poderiam potencialmente coordenar o momento da divisão nuclear com o da citocinese regulando o nível da proteína CYC6 no núcleo (79).

1.5.3 Mecanismos de interrupção do ciclo celular induzido por danos no DNA em *Trypanosoma brucei*

Como comentado anteriormente, os modelos eucariontes têm vias de sinalização bem caracterizadas que são ativadas para a interrupção do ciclo celular induzidas por danos no DNA, assim como também maquinarias de reparo muito eficientes e coordenadas com tais vias de sinalização de *checkpoint*.

Nos tripanosomatídeos esses mecanismos ainda não estão bem esclarecidos e precisam ser melhor caracterizados. Em *T. brucei*, o reparo do DNA nuclear tem sido bem estudado com genes envolvidos na via canônica da HR (93-95), porém a reação detalhada e a cinética de recrutamento dos componentes primários da via durante o reparo das lesões no DNA ainda não estão bem definidas. Em relação ao DNA mitocondrial, foi relatado recentemente que o *T. brucei* possui um reparo semelhante à do reparo do seu DNA nuclear, com a RAD51 promovendo a manutenção do genoma mitocondrial (96). Tais trabalhos mostram uma importante e conservada resposta do *T. brucei* em ativar a via HR em resposta a quebras no DNA nuclear e mitocondrial. Porém, as outras vias de reparo estão bem menos compreendidas. Por exemplo, em *T. brucei* alguns dos genes importantes envolvidos na via canônica NHEJ (DNA ligase IV e XRCC2) não foram encontrados no banco de dados do genoma (TriTrypDB), sugerindo fortemente que este mecanismo de reparo está ausente ou que divergiu mecanisticamente neste organismo (95).

Além disso, nenhum trabalho descreveu as funções das *PI3KK-related* do parasita na resposta a danos no DNA, apesar da fosforilação de várias proteínas de reparo de *T. brucei*, incluindo BRCA2, RAD50 e RPA1, terem sido descritas (95,97). A fosforilação dependente de dano da histona H2A de *T. brucei* em Thr130, gerando a variante de modificação da cromatina gH2A (X) também foi descrita (98), mas as proteínas quinases que direcionam essa alteração e a sua contribuição para a reparação não foram ainda detalhadas. Além disso, alguns genes que codificam para proteínas de reparo na via HR exibiram baixa identidade compartilhada com aqueles em mamíferos, como RPA-1, que não possui o domínio RPA70N N-terminal que está

envolvido em interações proteína-proteína durante a resposta a danos, e é importante para a ativação da via de sinalização da ATR em células de mamíferos. No entanto, essas peculiaridades parecem não influenciar as funções da RPA tripanosômica no reparo da recombinação homóloga na *Leishmania* (99). Até o momento, as informações mais relevantes para as vias de *checkpoint* associadas com as PI3KK em tripanosomatídeos foram descritas na *Leishmania*. Estes parasitas expressaram um homólogo 9-1-1 funcional no qual a subunidade Rad9 é encontrada em complexos alternativos e a Hus1 também existe como monômero, sugerindo uma flexibilidade funcional e compartimentalização da braçadeira 9-1-1 de esse tripanosomatídeo. Entretanto, os homólogos de elementos chave dessa via ainda não foram caracterizados, como o complexo ATR-ATRIP, TOPBP1 ou Chk1 (100).

Embora estudos tenham mostrado que o dano ao DNA desencadeia uma resposta robusta nos diferentes tripanosomatídeos, o papel das quinases PI3KK na resposta a danos e a sua cooperação com os mecanismos de reparo de DNA não estão bem estabelecidos (101).

2 OBJETIVOS

(A) Estabelecer a cinética de reparo de quebras de dupla fita de DNA nas formas replicativas de *T. brucei*.

(B) Investigar se formas replicativas de *T. brucei* contam com vias de sinalização de *checkpoint* frente a quebras no DNA e como essas vias afetam a dinâmica da replicação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Cultura de Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) foram mantidas em meio SDM-79 com 10% de soro fetal bovino a 28 °C. Ao atingir concentração de $\sim 10^7$ parasitas/mL, as células foram diluídas para concentração final de $\sim 10^6$ parasitas/mL.

3.2 *Tratamento com radiação ionizante e ensaio de viabilidade celular.*

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) em crescimento exponencial ($\sim 5 \cdot 10^6$ parasitas/mL) foram submetidos a diferentes doses de radiação ionizante (IR) (50, 100, 150 e 175) Gy em uma unidade *Gamma Cell 220* de cobalto 60, com uma taxa de 913 Gy/h, propriedade do centro de tecnologia das radiações do IPEN-USP.

3.3 *Ensaio fluorimétrico de detecção de quebras no DNA (TUNEL).*

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) em crescimento exponencial ($\sim 1 \cdot 10^8$ parasitas) foram irradiados com 50 Gy de radiação ionizante. As amostras foram coletadas por centrifugação a 1700 g durante 5 min e lavadas duas vezes em 1X PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, e 2 mM de KH_2PO_4 , pH 7.4). Os parasitas foram então fixados durante 20 min com 1% de metanol diluído em 1X PBS frio, que foi adicionado por gotejamento sob homogeneização suave. Os parasitas foram incubados durante a noite toda a 4 °C em 1 mL de solução de etanol 70%, diluída em 1xPBS estéril. Para a detecção do DNA fragmentado foi usado o kit Fluorimétrico TUNEL™ da *Promega*, seguindo as instruções do fabricante. Foram incluídos dois controles para a reação; um controle negativo C(-), onde não foi adicionada a enzima rTdT e um o controle positivo C (+), onde os parasitas foram pré-tratados com 50U da DNase I (*TermoFisher*) durante 10 min. Após incubação, os parasitas foram centrifugados a 2600 g por 10 min e homogeneizados por 10 min em PBS contendo 0.1% de Triton X-100 e 3% de BSA em PBS. As amostras foram então preparadas para microscopia de fluorescência e análise por citometria de fluxo (Figura 3.1). Nesta última, perfis positivos de fluorescência de 10.000 parasitas foram detectados usando o canal BL1A do citômetro de fluxo (*NxT Attune - Termo Scientific*).

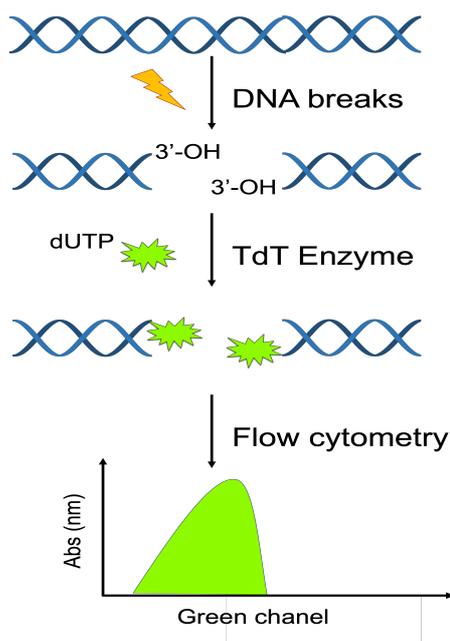


Figura 3.1- Esquema mostrando as marcações dos terminais quebrados de DNA pelo TUNEL.

3.4 Ensaio de imunofluorescência indireta (IIF).

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) em crescimento exponencial ($\sim 5 \cdot 10^6$ parasitas/mL) foram irradiados com 50 Gy. As amostras foram coletadas por centrifugação a 1700 g durante 5 min e lavadas duas vezes em 1x PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, e 2 mM de KH_2PO_4 , pH 7.4). Os parasitas foram então fixados por 15 min usando paraformaldeído 4% sob agitação suave e protegidos da luz. Parasitas lavados foram homogeneizados em 1x PBS e adicionados a lâminas de microscopia para aderir por 15 min. Os parasitas foram lavados três vezes nas lâminas durante dois minutos cada com solução de bloqueio (3% BSA em 1X PBS) e permeabilizados por 10 min usando 0.1% Triton X-100 diluído em 1X PBS estéril. Os parasitas lavados foram então incubados à temperatura ambiente durante 2 h em uma solução contendo: o anticorpo anti-gH2A (gentilmente cedido pelo *Centre Wellcome for molecular parasitology, Universidade de Glasgow*) ou anti-RPA1 (produzido em nosso laboratório), diluídos a 1:1000 em 1X PBS + 1% de BSA. Os parasitas foram lavados três vezes em lâminas e incubadas com solução de bloqueio por 20 min. Os parasitas foram então incubados por 1 h com uma solução contendo o anticorpo secundário α -IgG de camundongo Alexa Fluor 555 da *Thermo Scientific* diluído 1:500 em 1X PBS + 1% de BSA. Depois, os parasitas foram lavados cinco vezes e foi adicionado o meio *Vectashield Mounting Medium* contendo dicloridrato

de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como uma solução de montagem para o microscópio. As imagens foram adquiridas usando um microscópio de fluorescência *Olympus Bx51* (objetiva de 100X óleo) acoplado a uma lâmpada *EXFO Xcite 120Q serie* e uma câmera digital *Olympus XM10* sob o controle do software *Olympus Cell F*. As condições de captura das imagens foram definidas utilizando células controle. A intensidade da marcação foi estimada com base em 100 células por amostra utilizando as ferramentas do software. Para as provas de hipótese foi realizado um teste de comparação de médias usando o software *R Project for Statistical Computing - R*. Quando necessário, as imagens foram superpostas usando o próprio software do microscópio *Olympus Cell F* ou usando o software *ImageG Fiji*.

3.5 *Análise de conteúdo de DNA por citometria de fluxo.*

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) $\sim 5 \cdot 10^6$ parasitas/mL, foram irradiados com 50 Gy. Logo após amostras foram coletadas por centrifugação a 1700 g durante 5 min e lavadas duas vezes em 1X PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, e 2 mM de KH_2PO_4 , pH 7.4). Os parasitas foram então fixados durante 15 min com paraformaldeído 4% em 1X PBS sob agitação suave. Depois disso, eles foram lavados com 1X PBS + 1% BSA e permeabilizados por 15 min com uma solução contendo 1X PBS + 1% saponina + 1% BSA. Antes da coloração com iodeto de propídio (PI), uma gota dos parasitas foi adicionada para aderir nas lâminas de microscopia (*Tekdon*) para coloração com DAPI, a fim de identificar padrões morfológicos de núcleo e cinetoplasto. Os parasitas foram então lavados novamente e incubados por 45 min a 37 ° C com solução contendo: iodeto de propídio (PI) 10 $\mu\text{g/mL}$ e RNase 20 $\mu\text{g/mL}$ em 1xPBS. O conteúdo de DNA foi analisado usando 20.000 eventos em um citômetro de fluxo (*NxT Attune da Thermo Scientific*). As condições de leitura dos canais foram definidas com base nas células não tratadas da seguinte forma: FSC (320), SSC (360), BL1 (400), BL2 (620) e BL3 (540).

3.6 *Expressão proteica, purificação e produção de anti-soro anti-TbExo1.*

Para produzir a proteína recombinante Exo1 de *T. brucei* (TbExo1), a sequência da proteína (número de acesso: Tb427.05.2450-t26_1, Peso Molecular: 115876 Da, <http://tritypdb.org/tritypdb/>) foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico do

parasita. Na reação de PCR foram usados primers com sítios de restrição para as enzimas *Nhe* I e *Not* I (GCTAGCATGGGCGTGCCAAAGTTC e GCGGCCGCTCAAATTTGTA ACTTCACC). Os fragmentos amplificados foram inseridos no vetor de clonagem *pJET1.2/blunt* da *Thermo Scientific* e células da *E. coli XL1 Blue* foram transformadas com esse produto. Em seguida, as sequências removidas do vetor *pJET1.2/blunt* foram inseridas no vetor de expressão *pET-28a (+)* com um marcador 6XHis para facilitar a purificação da proteína a partir de extratos de cultura das células *E. coli BL21 Rosetta* transformadas. A expressão proteica foi induzida utilizando 1mM de *isopropil-tio-1-d-galactopirano* (IPTG) a 37 °C durante 4 h. As células foram coletadas por centrifugação (3200 g, 10 min, 4 °C) e resuspendidas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 1% N-lauroil sarcosina, PMSF 1 mM, ditioneitol 1 mM (DTT) e 1 x *cocktail* inibidor de protease). As células foram sonicadas a 4 °C seguida por centrifugação a 9000 g a 4 °C durante 20 min, pra separar o *pellet* do sobrenadante. As proteínas na fração solúvel foram carregadas em uma coluna de Níquel Sepharose (*Ni-NTA, Qiagen*), previamente equilibrada com tampão (50 mM Tris-HCl pH 7.5 e 0.3 M NaCl). As proteínas que estavam ligadas à coluna foram eluidas com tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl e 300 mM NaCl) num gradiente linear de pH (10, 8, 5 e 3). As amostras eluidas foram concentradas usando um *Amicon® Ultra-4* e recuperadas em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7.5 e 0.3 M NaCl). As proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE em um gel de corrida de 6%. A proteína rTbExo1 purificada foi então usada para gerar anti-soros específicos para TbExo1 (Proteimax, São Paulo).

3.7 *Western blot de proteínas em extrato total e diferencial*

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) $\sim 1 \cdot 10^8$ parasitas foram irradiados com 50 Gy. As amostras foram coletadas a cada hora durante 6 h por centrifugação a 1700 g durante 5 min e lavadas duas vezes em 1X PBS. Proteínas no extrato total dessas amostras foram obtidas usando tampão redutor 2x contendo: Tris 1M pH 7.0, 20% SDS, 5% glicerol, 0.1% azul de bromofenol e 5% p-mercaptoetanol. No caso de amostras para análise diferencial de proteínas ligadas ao DNA, as amostras coletadas na hora foram solubilizados durante 10 min a 4 °C sob agitação suave em solução de extração contendo: Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, sacarose 300 mM, MgCl₂ 3 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 0,5 mM, 0,1% de Triton X-100 e *cocktail*

inibidor de protease livre de EDTA (Sigma Aldrich). As amostras foram então sedimentadas a 2550 g durante 2min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados como a fração solúvel I (Figura 3.2).

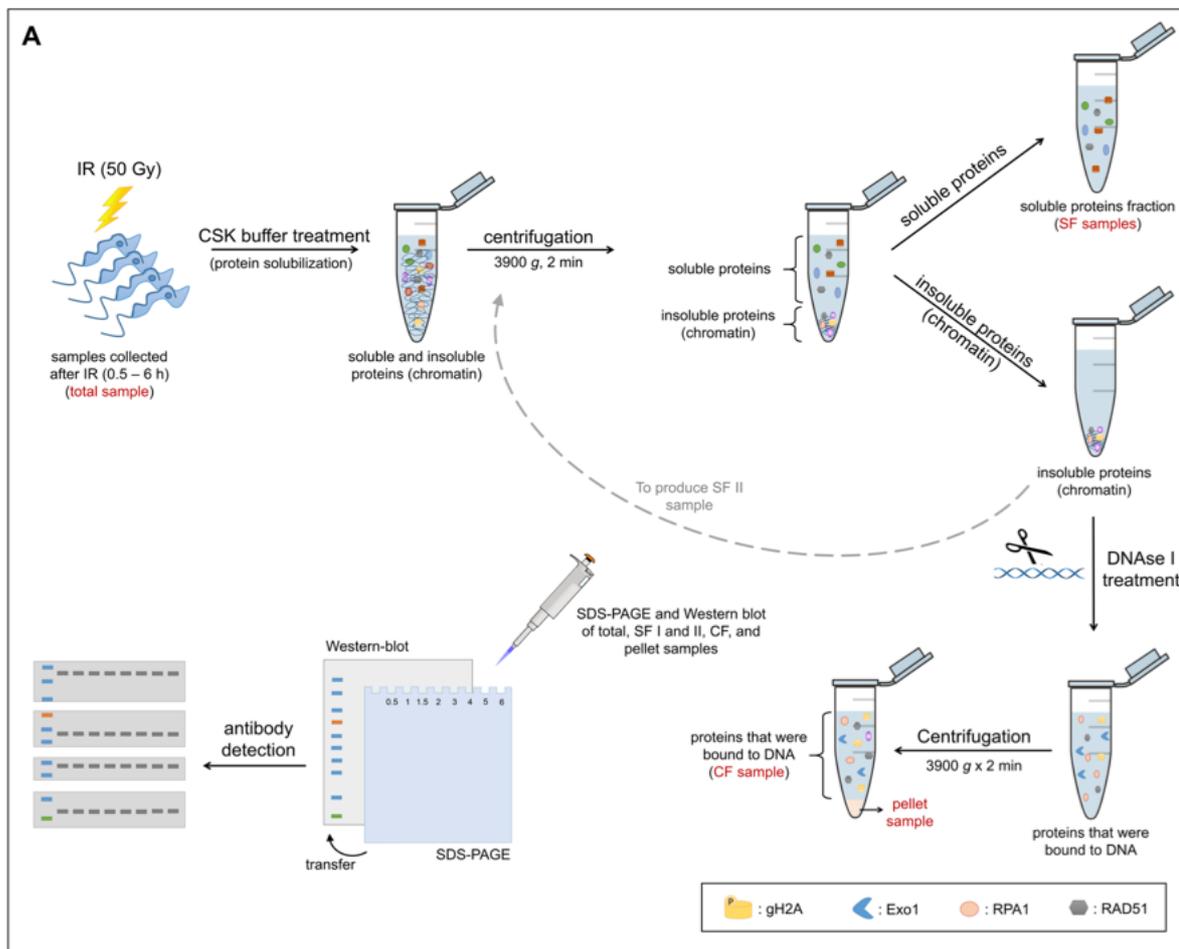


Figura 3.2- Ensaio de fracionamento e análise da cinética de reparo de DNA por *Western Blot* (95).

Os *pellets* foram tratados novamente com solução de extração, e a segunda rodada de sobrenadantes foi coletada como fração solúvel II. Os *pellets* foram tratados em seguida durante 30 min a 37 °C com 350U de DNase I (*ThermoFisher*) diluída em água esterilizada. As amostras foram então sedimentadas, e os sobrenadantes foram coletados como a fração liberada por DNase I. Para separação, as amostras em tampão redutor foram fervidas por cinco minutos a 95 °C, fracionadas por SDS-PAGE (30µL por linha) e transferidas eletroforéticamente a uma membrana de nitrocelulose (GE Life Science). Após o bloqueio das membranas usando 1X TBS contendo 5% de leite em pó, as membranas foram lavadas com 1X TBS + 0.05% Tween20 cinco vezes por cinco minutos cada. Depois de lavadas, as membranas foram cortadas e

incubadas à temperatura ambiente sob agitação suave durante 4 h com uma solução contendo os anti-soros: anti-gH2A (1:2000) gentilmente doado pelo *Wellcome Centre for Molecular Parasitology, University of Glasgow*), anti-RPA1 (1:1000), anti-EXO1 (1:5000) e anti-RAD51 (1:500) (gentilmente doado pelo *Wellcome Centre for Molecular Parasitology, University of Glasgow*) em TBS 1X + 3% de leite em pó. Como controles das frações solúveis da cromatina e controle de *loading* foram usados anti-soros: anti-HSP70 (1:10000) (Abcam), anti-GAPDH (1:3000) (gentilmente doado pelo Laboratório de Bioquímica de Tripanossomas - LaBTryps) e anti H3 (1:3000) (Abcam). Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano (HRP) durante uma hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a ligação do anticorpo foi detectada com o kit *Immobilon Western Chemiluminescent HRP* (Millipore). Para a análise quantitativa de bandas de proteínas nas membranas, as imagens digitais das membranas foram adquiridas utilizando o sistema de imagem por quimiluminescência e fluorescência UVITEC (*UVITEC Cambridge*). As densidades das bandas nas imagens foram quantificadas e normalizadas usando o software ImageJ (National Institute of Health).

3.8 *Tratamento com inibidores de quinases e ensaio de viabilidade celular*

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) na fase exponencial $\sim 5 \cdot 10^6$ parasitas/mL foram submetidos a diferentes concentrações do inibidor da quinase ATR (VE821-SML1415 Sigma Aldrich) ou inibidor da quinase ATM (KU55933-SML1109 Sigma Aldrich). O número de parasitas após a exposição dos inibidores foi contado a cada dia durante 5 dias numa máquina contadora de células (*Z series coulter*). Os parâmetros de configuração do aparelho foram estabelecidos para contar eventos entre 5 e 15 μM . O meio de cultura SDM79 completo e os inibidores de quinases foram renovados a cada dois dias.

3.9 *Monitoramento do ciclo celular utilizando análogos de timidina*

Para monitorarmos a transição das fases G1-S, S-G2, nós desenvolvemos uma metodologia que usa a dupla marcação com análogos de timidina para acompanhar a síntese de DNA de células tratadas e não tratadas. Assim, as formas procíclicas da cepa (Lister 427) ou formas procíclicas da linhagem 477 (células ATR/RNAi induzidas

com tetraciclina por 48 h) na fase exponencial $\sim 7 \cdot 10^6$ parasitas/mL, foram incubados na presença do análogo de timidina IdU (100 μ M) por 30 min. Nesse primeiro pulso uma população inicial de parasitas na fase S foi marcada pelo análogo (Figura 3.3).

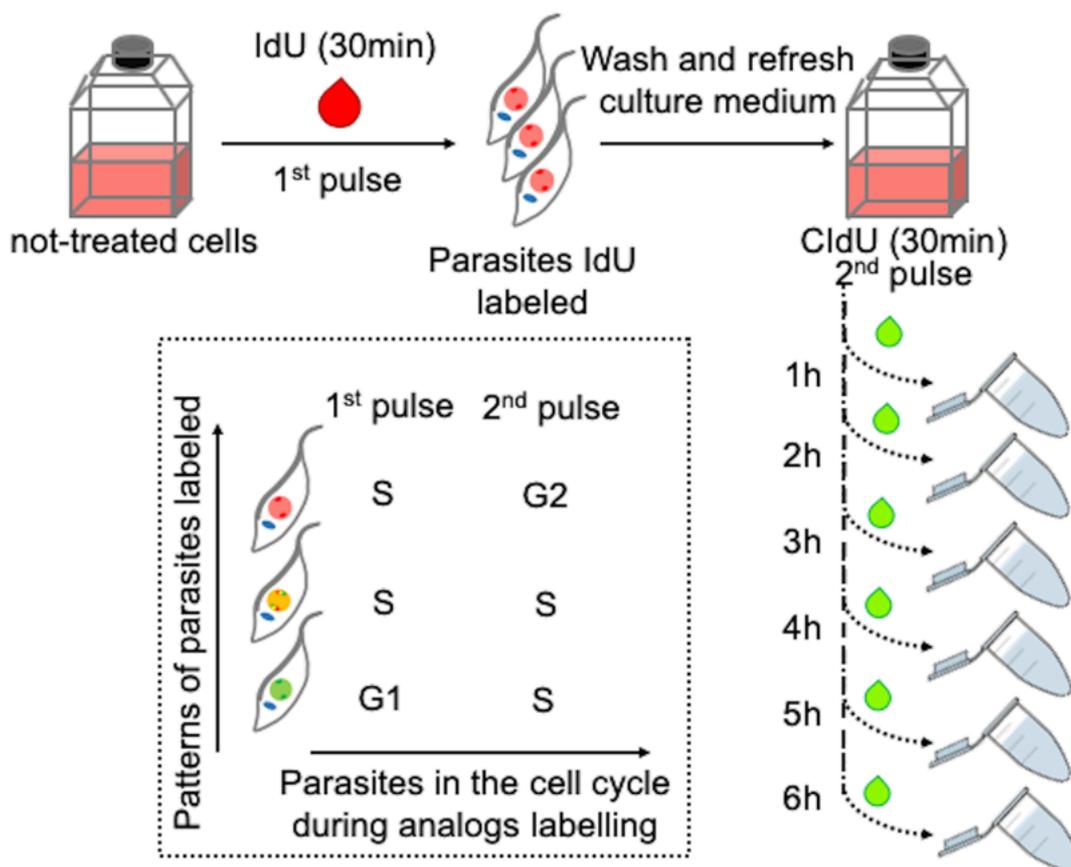


Figura 3.3- Avaliação do ciclo celular de *T. brucei* PCF pela co-deteccção de análogos de timidina.

No final do pulso de IdU, os parasitas foram expostos a diferentes tratamentos a seguir: (i) 50 Gy de radiação ionizante, ii) VE 821 (5 μ M) + 50 Gy, iii) KU55933 (20 μ M) + 50 Gy, iv) ATRi + 50 Gy. Após irradiação, as culturas foram centrifugadas a 1700 g durante 5 min para remover o primeiro análogo de timidina e em seguida homogeneizadas em meio de cultura SDM 79. Logo em seguida os inibidores das quinases foram adicionados novamente como descrito anteriormente. Para avaliar a capacidade dos parasitas expostos aos diferentes tratamentos para progredir com a síntese inicial de DNA ou de entrar na fase S, amostras foram coletadas a cada hora durante 6 h após os tratamentos. As amostras foram então mantidas na presença de um segundo análogo de timidina CldU (100 μ M) por 30 min (Figura 3.3). Após o segundo pulso, os parasitas foram lavados com 1X PBX a 1700 g por 5 min. As

amostras foram então fixadas com 500 μ L de paraformaldehído 4% (em PBS estéril) por 15 min sob agitação suave, protegidas da luz, e lavadas 2x com 1xPBS a 1700 g por 5 min.

Os parasitas foram colocados para aderir em lâminas revestidas com poli-L-lisina para microscopia por 15 min. Após a adesão nas lâminas, os parasitas nos poços foram permeabilizados com 0.2% Triton X-100 (em PBS estéril) por 15 min. Após lavagem, os parasitas foram tratados com HCl 4M durante 20 min à temperatura ambiente e depois neutralizados com tampão borato 0.2 M durante 10 min. Após lavagem os poços foram bloqueados em uma solução contendo, 1x PBS + 0.1% Triton + 3% BSA durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, os parasitas lavados foram incubados durante 1 h com uma solução de anticorpo anti-IldU específico (Anti-BrdU ref: 347580, *Becton Dickinson*) diluído 1: 300 em 1X PBS + 3% de BSA. Após lavagem (1XPBS + 0.05%Tween 20) os parasitas foram incubados durante 1 h com anticorpo anti-CldU específico (Anti-BrdU ref: OBT0030-BU1/75, *ACCU-SPECS*) diluído 1: 300 em 1x PBS + 3% BSA. Após a lavagem, os poços foram novamente bloqueados com 50% SFB durante 30 min. Após o bloqueio, os parasitas foram incubados durante 1 h com os anticorpos secundários α -IgG de camundongo Alexa fluor 568 + α -IgG de rato Alexa fluor 488 diluídos 1: 500 em 1x PBS + 1% BSA. Após lavagens, foram adicionados 2 μ L/poço do meio de montagem DAPI com *VECTASHIELD*[®]. As imagens foram adquiridas usando um microscópio fluorescente *Olympus Bx51* (objetiva de óleo 100x) acoplado a uma lâmpada *EXFO Xcite 120Q serie* e uma câmera digital *Olympus XM10* com software controlador *Olympus Cell F*. A condições de captura das imagens foram estabelecidas nas células controle. Um padrão de cores nas lâminas foi observado após o processo de co-deteção dos análogos incorporados durante os pulsos. Parasitas vermelhos: Foram identificados como parasitas na fase S durante o 1º pulso e na fase G2 durante o 2º pulso. Parasitas amarelos: Foram identificados como parasitas na fase S durante o 1º pulso e fase S durante o 2º pulso. Parasitas verdes: Foram identificados como parasitas na fase G1 durante o 1º pulso e fase S durante o segundo pulso (Figura 3.3).

3.10 Ensaio de DNA combing

Formas procíclicas da cepa (Lister 427) ou formas procíclicas da linhagem 477 (células ATR/RNAi induzidas com tetraciclina por 48 h) foram incubados na presença

do análogo IdU (100 μ M) por 7 min. Logo após os parasitas foram irradiados com 50 Gy e mantidos num segundo pulso com análogo CldU (100 μ M) por 21 min ou 42 min, sem lavagem intermediária. Os parasitas foram centrifugados a 1700 g por 5 min e resuspendidos em meio de cultura SDM-79 fresco. Para avaliar o efeito de quebras de DNA na dinâmica das forquilhas de replicação de DNA, um terceiro pulso foi feito com CldU (100 μ M) por mais 21 min as duas ou seis horas após a exposição à IR (Figura 3.4).

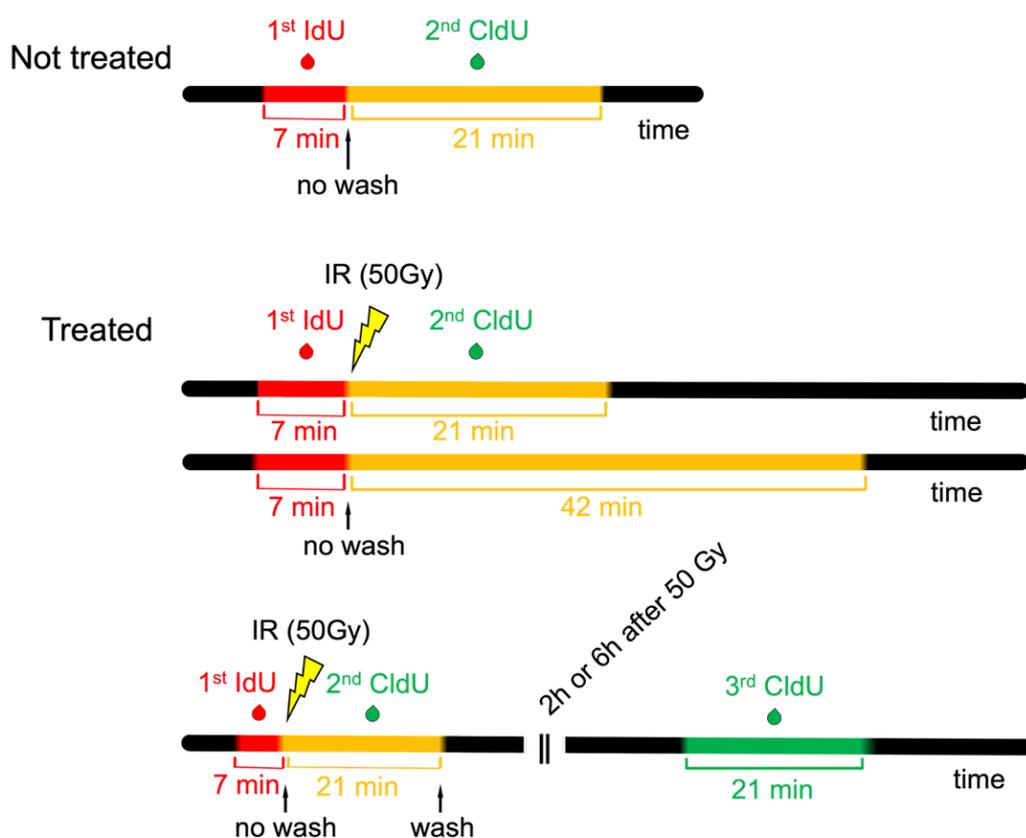


Figura 3.4- Análise dos efeitos das quebras de DNA na dinâmica da replicação mediante o *DNA combing*.

Em seguida, os parasitas foram lavados duas vezes com 1X PBS + Glicose 10 mM gelado a 1700 g durante 5 min a 4 °C. Os sedimentos foram resuspendidos em 100 μ L de uma solução contendo 1% de agarose *low melting* em tampão 1x LB (EDTA 0.1 M pH 8.0, Tris-HCl 10 mM, NaCl 20 mM). Após a solidificação, os plugs foram colocados em 300 μ L de tampão de lise (EDTA 0.5 M pH 8.0, 1% N – Laurilsarcosina, proteinase K 100 μ g/mL) a 50 °C por 24 h. No dia seguinte, os plugs foram ressuspendidos em tampão de lise fresco por mais 24 h. No terceiro dia os plugs foram

lavados com EDTA 0.5 M pH 8.0 para remover o excesso de tampão de lise. Nesse ponto, os plugs podem ser armazenados a 4 °C protegidos da luz por até uma semana. Em seguida, os plugs foram lavados em solução T10E1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) durante uma hora por 3 h. Na última lavagem, os plugs foram mantidos na solução de T10E1 durante a noite toda à 4 °C protegidos da luz. No dia seguinte, os plugs foram incubados em 1 mL de tampão MES 0.5 M, pH 5.5 a 68 °C durante 20 min e depois a 42 °C durante 10 min. Após as incubações foi adicionado 2 µL/plug da enzima β -agarose (EO0461, *Thermo Scientific*) aos tubos e mantidos durante a noite toda à 42 °C. No dia seguinte foi adicionado 1 mL do tampão MES nos reservatórios da máquina *Fiber Comb Genomic Vision* para esticar as fibras de DNA marcadas. As lamínulas de vidro (*engraved Combicoverslip COV-002-RUO*) com o DNA esticado foram fixadas a 65 °C por 4 h, protegidas da luz.

Após a fixação, o DNA foi desnaturado utilizando solução de NaOH 0.5 M + NaCl 1 M durante 8 min à temperatura ambiente e neutralizado por lavagens com 1xPBS1 durante 3 min/cada. Após as lavagens, o DNA nas lamínulas foi desidratado usando diferentes concentrações de etanol 70, 90 e 100% por 3 min/cada. As lamínulas foram secas ao ar e então bloqueadas numa solução contendo (1x PBS + 1% BSA + 0.1% Triton X-100) a 37 °C durante 30 min. Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas com 20 µL de uma solução contendo: 4 µL de anticorpos primários anti-IdU (Anti-BrdU ref: 347580, *Becton Dickinson*) e 1 µL do anti-CldU (Anti-BrdU ref: OBT0030 - BU1 / 75, *ACCU-SPECS*) em 1x PBS + 3% BSA a 37 °C durante uma hora. Após lavagens (1X PBS + 0.05% Tween 20) as lamínulas foram incubadas em 20 µL de uma solução contendo anticorpos secundários: 2 µL de anticorpo α -IgG de camundongo Alexa fluor 568 e 2 µL de anticorpo α -IgG de rato Alexa fluor 488 em 1XPBS + 3% BSA à 37 °C durante 45 min. Após lavagens, as lamínulas foram incubadas em 20 µL de uma solução contendo 0.33 µL do anticorpo primário anti- DNA de simples fita (*MAB3868-Millipore Corp.*) em 1X PBS + 3% BSA à 37 °C por uma hora. Após lavagens, as lamínulas foram incubadas com 20 µL de uma solução contendo 3 µL do anticorpo secundário α -ssDNA Alexa fluor 350 em 1X PBS + 3% BSA a 37 °C por 45 min. Após lavagens, foram adicionados 20 µL de *antifade Prolong® Gold* e o excesso do meio de montagem foi deixado secar ao ar durante a noite, protegido da luz.

No dia seguinte, as lamínulas foram seladas e analisadas usando o microscópio de fluorescência *Olympus BX51* com câmera digital *Olympus XM10* controlada pelo

software *Olympus Cell F*. Neste ensaio um padrão de cores nas lâminas foi observado após o processo de co-deteção dos análogos incorporados nas fibras de DNA esticadas. O padrão amarelo/vermelho observado nas fibras a partir dos pulsos assimétricos foi usado para o fator de alongamento da forquilha de DNA (DFEF - **DNA fork elongation factor**). Variações no fator DFEF (que é o comprimento do CldU incorporado - amarelo - dividido pelo comprimento do IDU incorporado - vermelho) indica processos de empacamento da forquilha de replicação após tratamentos com agentes genotóxicos quando comparados com células controle.

3.11 Extração de RNA total

Os extratos totais de RNA foram obtidos a partir de células pQ117-PCF, gentilmente doadas pelo *Center for Infectious Disease Research, Seattle, EUA*. As células pQ117-PCF são células procíclicas 29.13 que têm resistência a G418 e higromicina expressando o vetor *pQuadra* que conferi resistência à fleomicina. Na nomenclatura do vetor o número (117) refere-se ao gene Tb927.11.1468 (quinases relacionadas com fosfatidilinositol 3, putativo -ATR). Estas células foram nomeadas como *T. brucei 477 PCF* durante o processo de engenharia. As células foram mantidas em meio de cultura SDM-79 completo contendo 2.5 µg/mL de fleomicina, 15 µg/mL de G418 e 25 µg/mL de higromicina B a 28 °C. Para a quantificação do RNA do gene Tb927.11.1468 a partir do RNA total, as células foram induzidas a expressar o vetor usando tetraciclina 1 µg/mL durante 48 h. Após a indução ~5. 10⁷ parasitas foram coletados às 12, 24 e 48 h por centrifugação a 1700 g por 5 min. Depois, os *pellets* foram homogeneizados em 750 µL de *TrizolTM* por dois minutos mediante a pipetagem suave. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas por inversão durante 15 seg e logo, incubadas por 3 min à temperatura ambiente. Para permitir a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi colocada em um tubo novo e foram adicionados 500 µL de 100% isopropanol por inversão suave por 10 min. Para obter o RNA, os *pellets* foram lavados utilizando 75% de etanol fresco em 0.1% de água DEPC, centrifugados a 7500 g durante 5 min à 4 °C e seco ao ar durante 15 min. Os *pellets* foram resuspendidos em 20 µL de água DEPC e incubados em um bloco à 55 °C por 10 min. O RNA total nas amostras foi quantificado usando um Nanodrop 2000C e finalmente armazenado a -70 °C para quantificação por rT-qPCR.

3.12 rT-qPCR

Os oligonucleótidos qPCR117-F (TGATGGTATTCTGTGCCGTT) e qPCR117-R (CTGCCCAGTGAATCTGCTTA) foram utilizados para verificar o *knock down* do gene Tb927.11.14680 (*phosphatidylinositol 3-related kinases, putative-ATR*) e os oligonucleótidos GAPDH-F (CCAGTGGTGCTTGGGATGAT) e GAPDH-R (TCACTCGTACACAGCCACAC) para verificar a expressão do *housekeeping* Tb927.6.4280 (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal*). Os primers foram diluídos para uma concentração estoque de 100 µM em água estéril e armazenados a -20 °C. O kit *SuperScript™ III* foi utilizado para a síntese de cDNA. Em resumo, 14 µL de uma solução contendo: 4 µg de RNA, 1 µL de oligo dT e 1 µL de dNTPmix (10 mM) foram incubados a 65 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados à mistura: 4 µL de buffer 5x *First Strand*, 1 µL DTT (0.1 M) e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa para completar um volume final de 20 µL para a síntese de cDNA. Os tubos foram então incubados a 50 °C durante 1 h e a inativação foi feita a 70 °C durante 15 min. Neste ponto, o cDNA pode ser armazenado a -20 °C. Para rT-qPCR foi usada uma solução contendo: 2.5 µL de oligonucleótidos qPCR117-F (2.4 µM) e qPCR117-R (2.4 µM), 10 µL do *PowerUp™ SYBR® Green Master Mix* e 5 µL de cDNA (8 ng/mL). A quantificação foi feita no termociclador *StepOnePlus™* de acordo com o programa. Passo 1: (1x) a 95 °C durante 10 min. Paso 2: (40x) a 95 °C/15 seg + 60 °C /1 min. Curva de *melting*: (1x) a 95 °C/15 seg + 60 °C/1min + 95 °C/15 seg. Os dados foram exportados do aparelho e o *cycle threshold* (CT) foi obtido a partir do programa de PCR *LinReg*. A quantificação relativa do gene ATR foi realizada pelo método de *Schmittgen* ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) usando a equação: $\Delta\Delta C_T = (C_{T,ATR} - C_{T,GAPDH})Time_x - (C_{T,ATR} - C_{T,GAPDH})Time_0$.

3.13 Estimação da IC50 da Pentamidina e viabilidade celular

Formas procíclicas do *T. brucei* PCF na fase de crescimento exponencial $\sim 7 \cdot 10^6$ parasitas/mL cultivadas em meio fresco SDM-79, foram expostas a diferentes tratamentos, transferidas para placas de cultura de 96 poços e incubadas a 28 °C. A proliferação celular foi quantificada pela leitura da densidade óptica (DO) em 620 nm a cada 24 horas. Os valores da DO obtidos foram convertidos em densidades

celulares (células por mililitro) usando uma equação de regressão linear previamente obtida a partir de uma curva de calibração sob as mesmas condições (102,103). Os diferentes efeitos do tratamento foram avaliados em quadruplicata e os resultados correspondem a três ou quatro experimentos independentes, cada um feito em quadruplicata. Para obter a concentração da pentamidina correspondente com 50% de inibição do sinal de crescimento celular (IC50), os parasitas foram tratados com diferentes concentrações de pentamidina, ou não tratadas (controle de DMSO). A Memantina (300 μM) foi usada como controle de inibição da proliferação como descrito em (104). A concentração que inibiu 50% da proliferação do parasita (IC50: 0.4 nM) foi determinada durante a fase de crescimento exponencial (após 48 horas) ajustando os dados a uma curva típica de dose-resposta de forma sigmoidal usando o *GraphPad Prism*, versão 5 (102,103).

3.14 Tratamento combinado com inibidores de quinases, pentamidina e viabilidade celular

Numa placa de 96 poços, formas procíclicas da cepa (Lister 427) em crescimento exponencial $\sim 8 \cdot 10^6$ parasitas/mL foram submetidos a diferentes tratamentos, a seguir: i) DMSO (solvente da droga), ii) KU55933 (20 μM), iii) VE 821 (5 μM), iv) KU55933 (10 μM) + VE 821 (2.5 μM), v) IC50 da pentamidina, vi) KU55933 (10 μM) + IC50 da Pentamidina, vii) VE 821 (2.5 μM) + IC50 da Pentamidina e viii) KU55933 (10 μM) + VE 821 (2.5 μM) + IC50 da Pentamidina. A viabilidade celular após tratamento foi quantificada mediante leituras de densidade óptica (DO) a 620 nm durante 9 dias. Os valores de DO foram convertidos pra valores de densidade celular (células por mililitro) usando uma equação de regressão linear de calibração obtida antecipadamente nas mesmas condições para as células controle. O ensaio foi realizado em quadriplicada técnica e em triplicada biológica.

4 RESULTADOS

Nesse trabalho será analisada a resposta ativada no *Trypanosoma brucei* frente a exposição a agentes que geram quebras no seu DNA. Neste sentido, pretendemos investigar mecanismos moleculares envolvidos no processo de *checkpoint* e reparo de DNA para poder iniciar uma discussão de como esse conhecimento pode contribuir para o desenvolvimento de terapias anti-tripanosossoma.

Conforme acima os resultados desse trabalho foram divididos em três capítulos, a saber:

Capítulo I: Caracterização do mecanismo e cinética de reparo de quebras de DNA ativado nas formas procíclicas do *Trypanosoma brucei* em resposta a radiação ionizante. Foram avaliados os seguintes processos celulares: (i) Presença de marcadores de DSBs, (ii) ligação ao DNA das proteínas de reparo e cinética do mecanismo ativado.

Capítulo II: Principais funções das quinases ATM e ATR na resposta a danos no DNA ativada nas formas procíclicas do *Trypanosoma brucei* gerados em resposta a radiação ionizante. Foram avaliados os seguintes processos celulares: (i) inibição da incorporação de análogo de timidina, (ii) presença de forquilhas de DNA empacadas e/ou (iii) bloqueio das origens de replicação.

Capítulo III: Efeitos da droga Pentamidina no DNA e a influência das quinases ATM e ATR na ação da droga nas formas procíclicas do *Trypanosoma brucei* como uma prova de conceito. Foram avaliados: i) a presença de quebras no DNA gerados pela pentamidina e ii) a sensibilização dos parasitas a droga na presença dos inibidores das quinases ATM e ATR.

CAPÍTULO I

4.1 *Trypanosoma brucei* ativa a via de reparo por recombinação homóloga (HR) em resposta a quebras no DNA geradas pela exposição à radiação ionizante

Como comentado na introdução do trabalho, nos modelos eucariontes o processo de reparo pela via de recombinação homóloga envolve o recrutamento de proteínas especializadas de uma forma sequencial e coordenada para que o reparo do DNA aconteça (Figura 1.8A). Vários trabalhos apontam para a ativação de uma via de HR canônica em *T. brucei*, pelo menos nas formas sanguicola (93-94). No entanto, a reação detalhada e a cinética de recrutamento dos agentes primários da via HR no DNA durante o reparo de DSBs não tem sido bem detalhada. Nesse capítulo, nós apresentamos a cinética de recrutamento da via HR nas formas procíclicas do *T. brucei* em resposta as DSBs geradas pela radiação ionizante (IR). Para isso, monitoramos i) a ligação na cromatina das principais proteínas de reparo dessa via: EXO1, RPA1 e RAD51, assim como ii) a atividade de uma via que fosforila a variante de histona tripanosomal H2A indicando quebras de DNA. Os dados apresentados estão publicados no periódico científico *Scientific Reports da Nature* (2018) 8:5405 | [DOI:10.1038/s41598-018-23731-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-23731-6).

4.1.1 Impacto da radiação ionizante na sobrevivência de *T. brucei*.

Uma das fontes mais comuns de quebras no DNA é a exposição a radiação ionizante, a qual pode ser gerada por fontes naturais, como por exemplo a radiação cósmica e radiação gama, e pelas fontes artificiais como aparelhos de raios X e radioterapia. A radiação ionizante pode induzir uma variedade de lesões radioquímicas no DNA de forma direta e indireta. A ação direta ocorre quando partículas de alta energia alfa ou beta rompem fisicamente, ambos os esqueletos de açúcar-fosfato do DNA gerando DSBs (105). Para estudar a cinética de recrutamento da via de reparo HR numa cultura de células não-sincronizadas das formas procíclicas de *T. brucei*, primeiro nós ajustamos as condições do tratamento. Nós submetemos os parasitas a diferentes doses de IR (50, 100, 150 e 175) Gy para estabelecer a dose mínima que poderia deter o crescimento celular de forma reversível, o que indicaria um processo de recuperação acontecendo. Na Figura 4.1, observamos que 50, 100 e

150 Gy de radiação ionizante interromperam a proliferação celular 6 h após o tratamento. Além disso, uma dose de 50 Gy levou a uma parada significativa na proliferação celular que foi recuperada 24 h após a exposição à IR sugerindo que o dano ao DNA induzido por 50 Gy pode ser reparado.

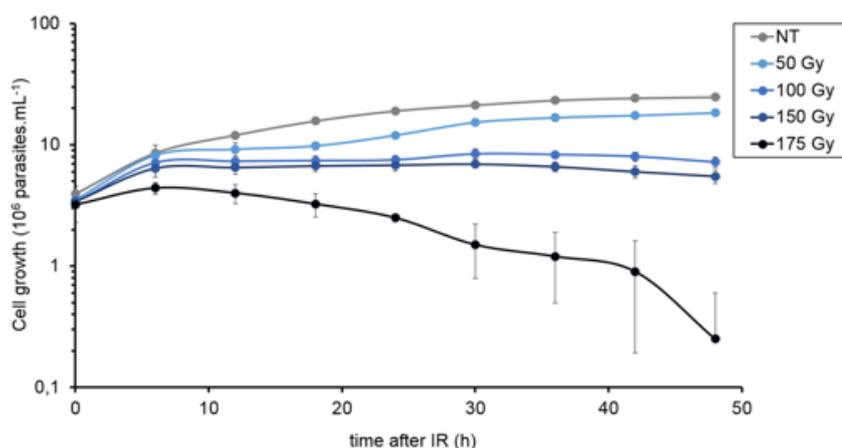


Figura 4.1- Reversibilidade celular após o tratamento com IR. O gráfico mostra o crescimento celular a cada 12 h até 48 h depois da exposição a IR. Os dados representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão (95).

4.1.2 A radiação ionizante gera fragmentação do DNA e a fosforilação da variante de histona H2A.

Para determinar se o tratamento com IR gera quebras na cadeia de DNA, nós realizamos o ensaio de marcação de terminais de DNA usando a enzima *desoxinucleotidil-transferase* (TdT) (Figura 3.1). Após o tratamento com IR, os parasitas foram marcados usando o *kit TUNEL™* e a intensidade da fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo. Como foi comentado na metodologia, a amostra C (-) foi tratada na ausência da enzima TdT e, portanto, nenhum sinal foi detectado. Isso significa que o pico do controle negativo não deve ser considerado como sinal positivo e, portanto, é considerado um sinal de fluorescência intrínseco basal emitido pelo parasita nessa longitude de onda do canal. Por outro lado, a amostra C (+), corresponde a células tratadas com DNaseI para garantir a geração de alta quantidade de quebra de DNA. Portanto, nesse caso o sinal máximo de intensidade de fluorescência foi observado. Assim, qualquer sinal entre o pico negativo C (-) e positivo C (+) foi considerado como TUNEL positivo que significa a ocorrência de fragmentos de DNA. Considerando o anterior, os sinais TUNEL positivos foram observados

durante a primeira 1.5 h após o tratamento com IR (Figura 4.2A), sugerindo que a exposição a IR gera quebras de dupla fita no DNA nas formas procíclicas do *T. brucei*.

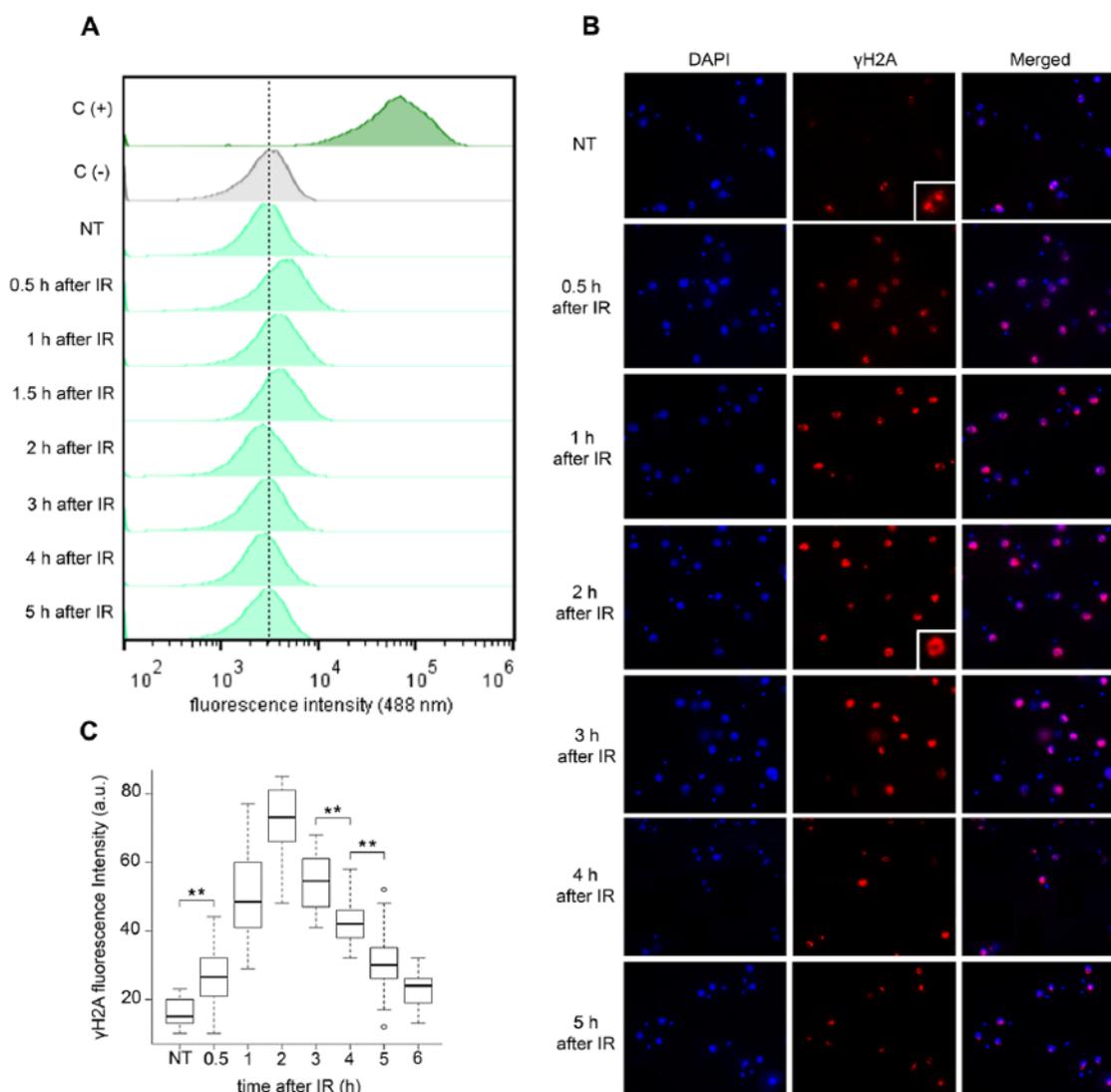


Figura 4.2- Detecção de fragmentação de DNA e fosforilação da variante da histona H2A após IR. Os parasitas foram tratados com 50 Gy de IR. (A) a fragmentação do DNA foi medida usando a enzima *desoxinucleotidil-terminal transferase* (TdT-TUNEL). C (-) representa um controle negativo no qual a enzima TdT não estava presente. Em C (+) as amostras foram pré-tratadas com DNase I gerando assim a máxima intensidade de fluorescência positiva. Linha pontilhada foi usada para indicar o pico que significa fluorescência negativa. (B) As células foram analisadas por IIF para verificar a intensidade de fluorescência do marcador γH2A após o tratamento com IR. (C) Os *boxes plots* representam a medida da intensidade de fluorescência de γH2A no ensaio IIF. Os dados representam a média de 100 células analisadas e as barras representam o desvio padrão. (**) Indicam diferenças significativas em comparação com as células não tratadas através dos testes de *Friedman* e *Wilcoxon* executados no *software R-Studio* (95).

Já que as DSBs demonstraram desencadear a fosforilação da variante de histona H2A nas formas sanguícolas de *T. brucei* (98), para confirmar a presença de DSBs após o tratamento com IR, investigamos a fosforilação da variante de histona H2A (gH2A) ao longo do tempo após o tratamento com IR usando um anticorpo específico anti-gH2A (98) em um ensaio de imunofluorescência indireta (IIF) (Figura 4.2B).

Um sinal positivo significativo foi obtido durante as primeiras 6 h após a exposição a IR em células tratadas em comparação com os parasitas não tratados (teste de Wilcoxon, $p=3,94 \times 10^{-12}$) (Figura 4.2B e C). O máximo de sinal obtido foi observado duas horas após o tratamento (Figura 4.2C). Nesse ensaio nós observamos sinais gH2A positivos em parasitas não tratados (controle), distribuídos em pequenos focos, em quanto a fluorescência gH2A em parasitas tratados com IR foi observada dispersa em todo o núcleo (Figura 4.2B, ver imagens de zoom). O padrão disperso observado após IR é provavelmente devido aos DSBs generalizados causados pela IR em todo o DNA genômico do parasita.

4.1.3 A expressão da proteína de replicação A (RPA1) aumenta após o tratamento com IR.

Considerando que os nossos resultados de TUNEL e gH2A sugerem que o maior dano no DNA é atingido duas horas após o tratamento com IR, nós testamos se o DNA danificado foi reparado após esse período. Para detectarmos eventos de reparo de DNA, nós primeiro investigamos o comportamento da proteína RPA1, a principal subunidade do complexo RPA. A RPA é a principal proteína de ligação de cadeia simples em eucariotos, e é um componente que participa de muitas vias de reparo do DNA (106). De fato, o nosso laboratório tem mostrado que a RPA é importante para o reparo de DNA em *Trypanosoma cruzi*, assumindo um padrão nuclear pontuado após tratamento com UV e hidroximetilureia em comparação com um padrão nuclear disperso nas células controle (76).

Usando anti-soro anti-RPA1 produzido no nosso laboratório em um ensaio de IIF, nós observamos um aumento na intensidade de fluorescência da RPA1 no núcleo quando comparado com células não tratadas, nos primeiros 30 min a 2 h após o tratamento com IR (teste de Wilcoxon, $p = 2.41 \times 10^{-13}$). A medida máxima de

imunofluorescência da RPA1 no núcleo foi observada a 1 h após o tratamento com IR (Figura 4.3A e B).

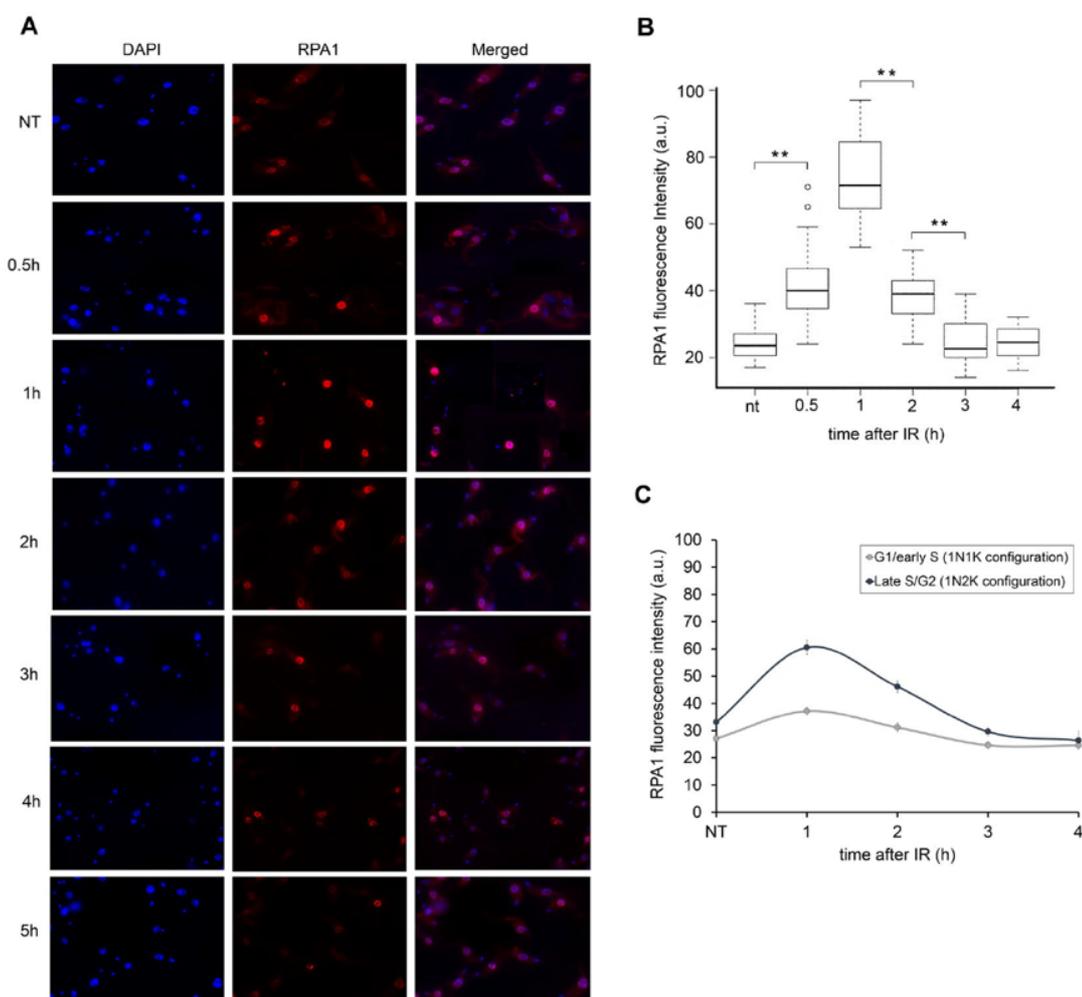


Figura 4.3- A expressão da proteína de replicação A (RPA1) aumenta após o tratamento com IR.

(A) Imunofluorescência usando anti-RPA1 (B) *Box-plot* representando a intensidade de fluorescência da RPA1 no ensaio IIF apresentado em (A). Os dados representam a média de 100 células analisadas, e as barras representam o desvio padrão. (**) Indicam diferenças significativas comparadas com às células não tratadas. (C) intensidade de fluorescência de RPA1, de acordo com as fases do ciclo celular (G1/*early S* e *late S/G2*). Os dados representam a média de 50 células analisadas para o padrão G1/*early S* e 15 células analisadas para o padrão *late S/G2* (95).

Nós também monitoramos a intensidade de fluorescência de RPA1 de acordo com as fases do ciclo celular, segundo os padrões N/K (1N1K -G1/*early S* e 1N2K -*late S/G2*) e observamos que o pico predominante da RPA1 ocorreu apenas nas células em *late S/G2* (Figura 4.3C). Considerando os dados anteriores, nós sugerimos que a via de reparo de DNA responsável pela reparação de DSB em G1/*early S*, se

existir, é menos dependente (ou independente) da subunidade de proteína RPA1 nas formas procíclicas do *T. brucei*.

4.1.4 Algumas proteínas da via HR são *up*-reguladas após o tratamento com IR.

Já que detectamos aumento da expressão de RPA1 após o tratamento com IR, nós então investigamos os níveis de outras proteínas envolvidas no processo de HR. Além do marcador de *checkpoint* gH2A e da proteína de reparo TbRPA1, nós monitoramos os níveis das proteínas TbExo1 e TbRAD51 durante 6 h após o tratamento com IR. EXO1 é uma das exonucleases que faz a ressecção da DSB, gerando ssDNA que recruta RPA e RAD51 desloca RPA do DNA e inicia o processo de recombinação, buscando sequencias homólogas no genoma. Com a finalidade de monitorar a regulação da TbExo1, nós geramos anti-soro contra essa proteína, clonada e purificada como descrito na metodologia. A expressão, purificação e teste do anti-soro gerado contra a proteína são apresentados na Figura 4.4.

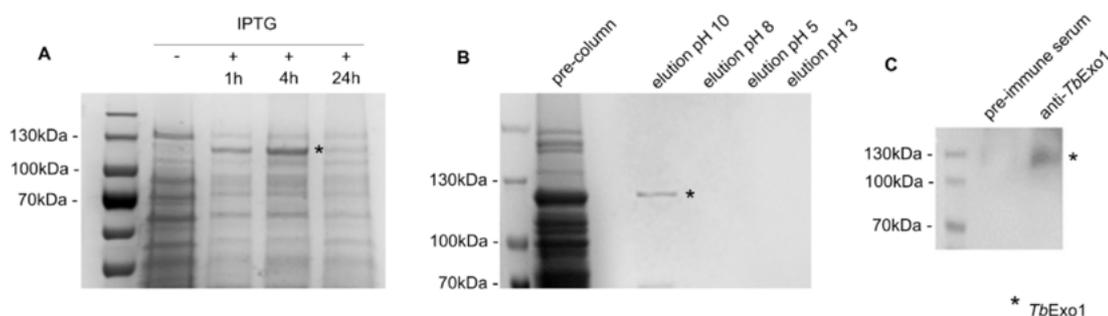


Figura 4.4- Expressão, purificação e anti-soro gerado contra rTbExo1. A) rTbExo1 (~ 116 kDa) foi clonada e expressada na presença de IPTG num sistema procariótico. B) rTbExo1 Foi purificada utilizando uma coluna de níquel e eluida com um gradiente linear de pH. C) Os extratos proteicos de células de *T. brucei* foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas com o anti-soro produzido anti-rTbExo1. (*) representa a rTbExo1.

Para a análise da regulação das proteínas de reparo, nós preparamos lisados de parasitas totais expostos a IR e os comparamos contra lisados de parasitas não tratados mediante análise de *Western blot* (WB). A quantificação das intensidades de banda no WB para TbExo1, TbRPA1 e TbRAD51 mostrou que essas proteínas atingiram seus níveis máximos nos extratos totais 1 h após o tratamento com IR

(Figura 4.5A), concomitante com o aumento da intensidade de fluorescência da TbRPA1 no ensaio da Figura 4.3B. Semelhante ao observado no ensaio de IIF da gH2A, as membranas de WB de parasitas não tratados exibiram níveis basais de gH2A. Também o WB mostrou níveis basais de TbRAD51 e TbExo1 no extrato total de parasitas não tratados, provavelmente em correspondência com a presença de quebras de DNA basal (gH2A) detectado na Figura 4.2B. Além disso, uma dupla banda de TbRPA1 foi observada uma hora após ao tratamento com IR (Figura 4.5A-triângulo vermelha), o que hipotetizamos pode ser o resultado de uma modificação pós-traducional da sub-unidade da proteína em resposta ao dano por IR.

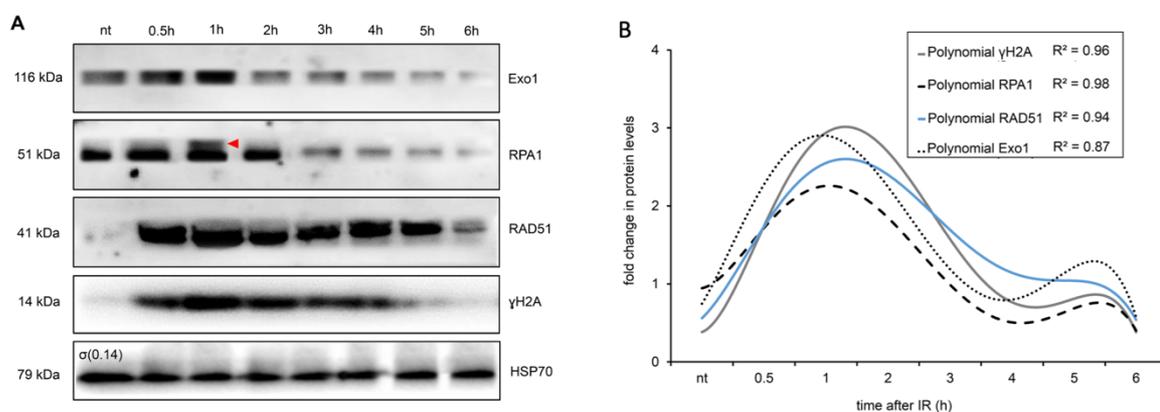


Figura 4.5- Proteínas de reparo de recombinação homóloga (HR) no extrato proteico total após IR. (A) WB do extrato proteico total das formas procíclicas do *T. brucei* após 50 Gy de exposição a IR. A proteína HSP70 foi usada como controle de *loading*. O triângulo vermelho na WB da RPA1 representa uma possível modificação da proteína RPA1. (B) Regressão polinomial de sexto grau das quantificações das intensidades nas bandas dos cortes das membranas em cada caso analisado. As curvas de estimação não paramétricas e o fator R^2 são apresentados. Notavelmente, as membranas de *Western blot* foram cortadas para evitar reações cruzadas entre os anticorpos durante o ensaio. Modificado de (95).

Em resumo, os dados até aqui sugerem que as proteínas de reparo analisadas e que participam da via canônica de reparo HR foram *up-reguladas* aproximadamente 1 h após o tratamento com IR. Na tentativa de ajustar melhor a cinética de recrutamento sequencial dessas proteínas, foi realizada uma análise de estimação não paramétrica das medições de quantificação das intensidades de banda no WB. As curvas polinomiais de sexto grau diferenciam um pouco melhor os tempos da *up-*

regulação do parasita sendo estimadas entre 45 min e 1.5 h após o tratamento com IR (Figura 4.5B).

4.1.5 A maquinária de recombinação homóloga é rapidamente recrutada para o DNA após o tratamento com IR.

Os dados acima sugerem que os parasitas respondem aos danos no DNA gerados pela IR mediante a regulação das proteínas da via de reparo HR. Assim, nós fomos avaliar se a TbExo1, a TbRPA1 e a TbRAD51 estavam sendo recrutadas para o DNA após o tratamento com IR. Para distinguir entre as proteínas solúveis e as ligadas ao DNA, nós preparamos extratos de proteína fracionada, como mostrado na Figura 3.2, com o objetivo de isolar as proteínas ligadas ao DNA em parasitas não tratados e tratados em diferentes tempos após o tratamento com IR. Este protocolo envolve a extração de proteínas solúveis após a permeabilização (monitorada pelo marcador GAPDH) e, em seguida, a extração de proteínas ligadas a cromatina após a digestão com DNase I (monitorada pelo marcador Histona H3) (Figura 4.6).

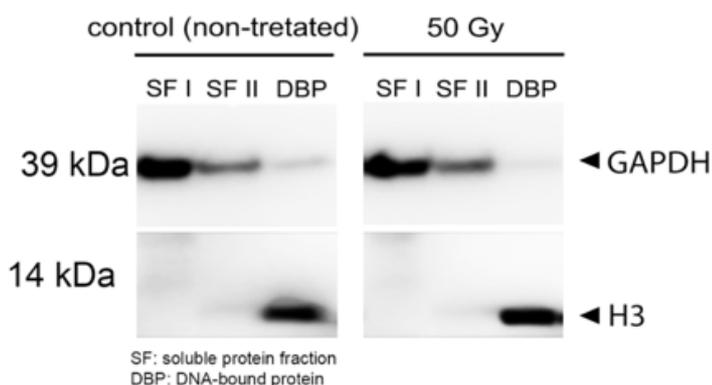


Figura 4.6- Controle do ensaio de extração fracionada de proteínas. As células foram expostas a IR e tratadas com tampão de lise para obter proteínas solúveis (fração solúvel - SF). Após um segundo ciclo de tratamento com tampão de lise, os *pellets* foram digeridos com DNase para obter proteínas ligadas ao DNA (DBP). As amostras foram então submetidas a SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anti-GAPDH e com anti-histona H3 (95).

Antes de analisar o recrutamento das proteínas para a cromatina, nós primeiro fomos estudar qual das formas da RPA1 detectadas no extrato total de *T. brucei* (Figura 4.5A-triângulo vermelho), estava interagindo com o DNA após dano. Para

responder essa questão, as amostras obtidas 1 h após o IR foram corridas no mesmo gel de SDS-PAGE. Em células não tratadas, a banda de menor peso molecular da sub-unidade RPA1 foi ligada ao DNA, enquanto a banda de maior peso molecular de RPA1 foi ligada ao DNA nas células após o tratamento com IR (Figura 4.7A). Para melhor visualizarmos as isoformas de RPA1 superior e inferior, nós separamos de novo estas amostras em outro gel SDS-PAGE aplicando uma quantidade maior de amostra e permitindo uma melhor resolução na região das isoformas RPA1 (Figura 4.7B). Curiosamente, nós observamos que no extrato total ambas as isoformas da RPA1 estavam presentes tanto em células tratadas quanto em células não tratadas (Figura 4.7A).

No entanto, a RPA1 de menor peso molecular foi a banda predominante ligada ao DNA em células não tratadas, enquanto a RPA1 de maior peso molecular é a banda predominantemente ligada ao DNA após o tratamento com IR (Figura 4.7A e B, seta vermelha).

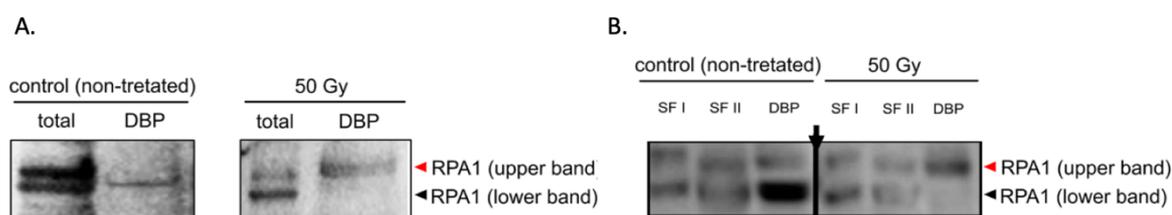


Figura 4.7- Ensaio de fracionamento e análise de WB de bandas de RPA1 após IR. (A e B) Perfil de migração molecular de peso da proteína RPA1 no extrato total, na fração proteica solúvel (SF I e II) e na fração proteica ligada ao DNA (DBP) em células controle e tratadas com IR. A seta no painel B indica uma região onde uma linha foi excluída do gel, mas todas as amostras foram analisadas em um único gel (95).

Além de identificar a isoforma da proteína RPA1 que estava presente no DNA após o dano, a quantificação de proteínas ligadas ao DNA revelou níveis aumentados de TbExo1 ligado ao DNA 30 min após IR acompanhando pelo aumento gradual na TbRPA1 ligada ao DNA e a fosforilação da variante de histona H2A (Figura 4.8A).

A máxima intensidade da proteína TbRPA1 ligada ao DNA foi atingida 1.5 h após o tratamento (Figura 4.8A, RPA1), aproximadamente ao mesmo tempo que foi observado uma diminuição nos níveis TbExo1 (Figura 4.8A, B).

Duas horas após o tratamento com IR, a intensidade da TbRPA1 ligado ao DNA diminuiu e o nível da gH2A atingiu seu máximo. Juntamente com o TbRAD51 ligado ao DNA (ou seja, 2-5 h após o IR), foi observada uma desfosforilação gradual de gH2A.

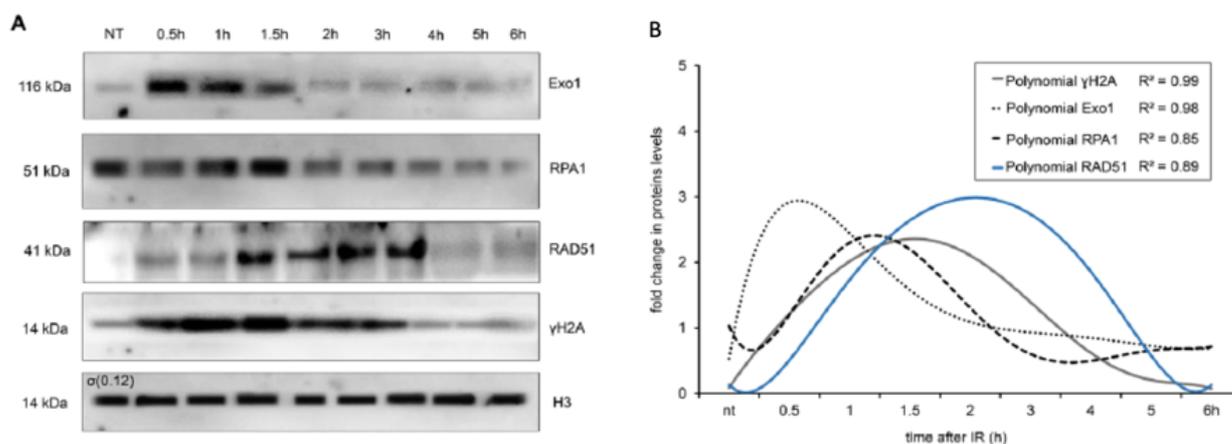


Figura 4.8- Recrutamento de proteínas de reparo da via de recombinação homóloga (HR) para o DNA após IR. (A) análise WB de proteínas ligadas ao DNA (DBP) derivadas do ensaio de fracionamento após o tratamento com IR. A proteína H3 foi usado como controle interno. (B) Regressão polinomial de sexto grau das quantificações do WB. As curvas de estimação não paramétricas e os fatores R^2 são apresentados (95).

4.1.6 As quebras no DNA induzidas pela radiação ionizante são reparadas eficientemente durante as fases *lateS/G2* do ciclo celular.

Embora os dados acima sugerem que o processo de reparo de DSB pela via HR leva ~6 h, como demonstrado pela liberação de TbRAD51 do DNA, juntamente com o declínio no sinal gH2A no DNA (Figura 4.8B), foi observado o comprometimento do crescimento celular de 6 a 18 horas após IR, como mostrado na Figura 4.1. Tal interrupção do crescimento da população de parasitas na cultura após dano levanta a questão sobre o por que as células de *T. brucei* permanecem paradas nesses tempos se o reparo do dano ao DNA é resolvido pela via HR nas primeiras 6 h após tratamento com IR. Considerando então que as espécies de tripanosomatídeos não possuem algumas das proteínas essenciais da via NHEJ canônica, que ocorre ao longo do ciclo celular e é um mecanismo predominante de reparo de DSB na fase G1, nós levantamos a seguinte possibilidade: os parasitas com DSB em G2 foram reparados por HR em G2, no entanto, aqueles com DSB em G1 e *earlyS* não foram reparados por HR e devem estar mantendo um *checkpoint* ativado nestas fases. Isso explicaria o retardo do retorno do crescimento.

Para verificar esta possibilidade, nós analisamos o perfil de conteúdo de DNA dos parasitas tratados com IR no período de 0 a 6 h após o tratamento e comparamos os resultados com os parasitas não tratados. Os perfis de conteúdo de DNA revelaram uma diminuição gradual na prevalência de células na fase G2/M após o tratamento com IR, com a menor quantidade de células nessas fases ocorrendo 6 h após o tratamento com IR (Figura 4.9A e B). Além disso, nós também observamos parasitas que gradualmente se acumulam nas fases G1/S começando 3 h após IR (Figura 4.9A, B). Esses dados acima sugerem que as formas procíclicas de *T. brucei* têm uma via de *checkpoint* que detecta danos no DNA na transição G1/S. Provavelmente então, o reparo em G1/*earlyS*, se existe, leva mais de 6 h para ser finalizado.

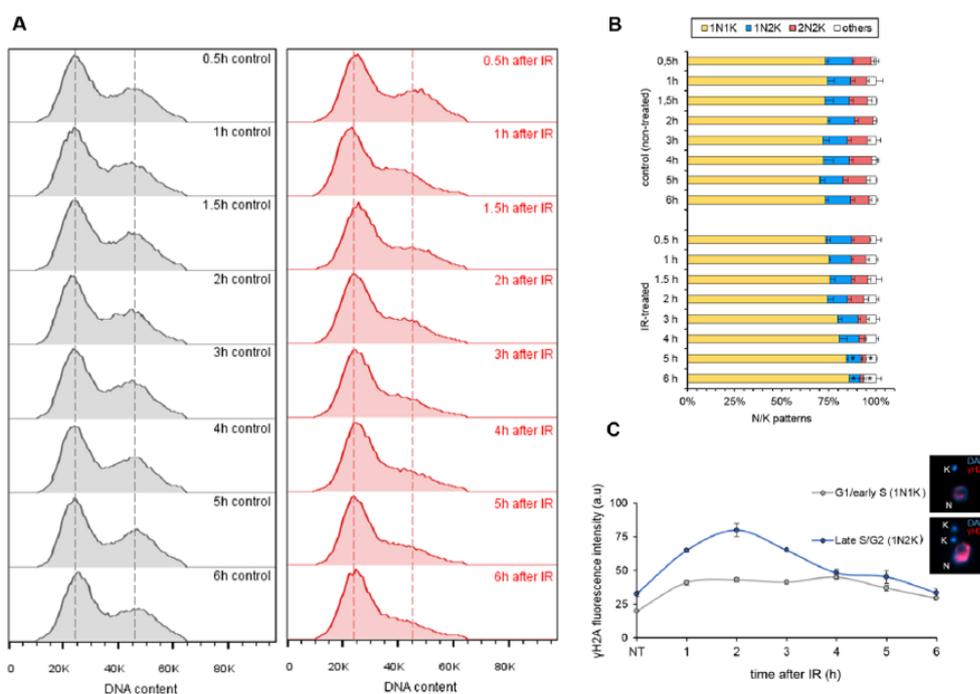


Figura 4.9- Efeitos da resposta ao tratamento com IR no ciclo celular. (A) análise do conteúdo de DNA de células coradas com PI. Os histogramas vermelhos representam as células tratadas com IR e os histogramas cinzas representam as células não tratadas. Este ensaio foi realizado em triplicada. As linhas pontilhadas representam o pico de intensidade de fluorescência das células em G1/S (pico esquerdo) e de células em G2/M (pico direito). (B) Representa a medição dos padrões N/K através da coloração com DAPI de células tratadas e não tratadas: 1N1K (*G1/earlyS*); 1N2K (*lateS/G2*); 2N2K (Citocinese) e outros (>2N/>2K). Os dados representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão para um n=100 amostras. (C) Intensidade de fluorescência de gH2A, de acordo com o ciclo celular fases (*G1/earlyS* e *lateS/G2*). Os dados representam a média de 50 células analisadas nas fases *G1/earlyS* e 15 células analisadas da fase tardia *lateS/G2* (95).

Finalmente, para confirmar que a cinética detectada para a via de reparo HR observada na Figura 4.8 é um processo que ocorre durante as fases *lateS/G2*, nós testamos se o padrão de fosforilação/desfosforilação do marcador de quebras de DNA gH2A acontecia também nessas fases. Nesse caso, nós repetimos a análise de intensidade do sinal gH2A após IR comparando a intensidade do sinal das células nas fases *G1/earlyS* (padrão 1N1K) com células no *lateS/G2* (padrão 1N2K). Os resultados mostram que o pico predominante do marcador gH2A (Figura 4.9C) ocorre predominantemente nas células com padrões morfológicos correspondentes com as fases *lateS/G2* (Figura 4.9C), apoiando a ideia de que a cinética da via HR descrita até aqui atua predominantemente em células nas fases *lateS/G2*.

4.1.7 Considerações finais do Capítulo I

Em resumo, os DSBs induzidos pela exposição a 50 Gy levam a um rápido recrutamento da exonuclease Exo1 para os locais de DSBs de DNA durante a primeira meia hora após o tratamento com IR. Em seguida um pico de RPA1 ligada ao DNA é atingido a 1.5 h quando a interação entre Exo1 e os terminais quebrados do DNA diminui. Além disso, a fosforilação máxima de gH2A é atingida entre 1.5 e 2 h após o IR. Neste período e até duas horas após o IR, a presença da RPA ligada ao DNA diminui, enquanto a RAD51 ligada a DNA aumenta. Juntamente com as interações entre o RAD51 e o DNA (2-5 h após IR), a desfosforilação da gH2A acontece. O processo completo de reparo das DSBs leva aproximadamente 5.5 horas, como mostrado pela diminuição nos níveis da gH2A e o número mínimo de parasitas nas fases G2/M nesse ponto (Figura 4.10).

Considerando todos os nossos dados até aqui, nós sugerimos que as DSBs geradas pela exposição a IR das formas procíclicas de *T. brucei* são reparadas pela via HR durante as fases *lateS/G2*. Além disso, nós observamos que uma resposta de *checkpoint* poderia estar detendo as células na transição G1-S, onde provavelmente ocorre um processo de reparo de DSBs que usa uma via independente das proteínas da via HR. Este processo de reparo leva mais de 6 h, já que uma parada no crescimento dos parasita > 6 h pós IR (Figura 4.1) foi observado. As vias de *checkpoint* ativadas no parasita em resposta a quebras de DNA estão apresentadas no seguinte capítulo.

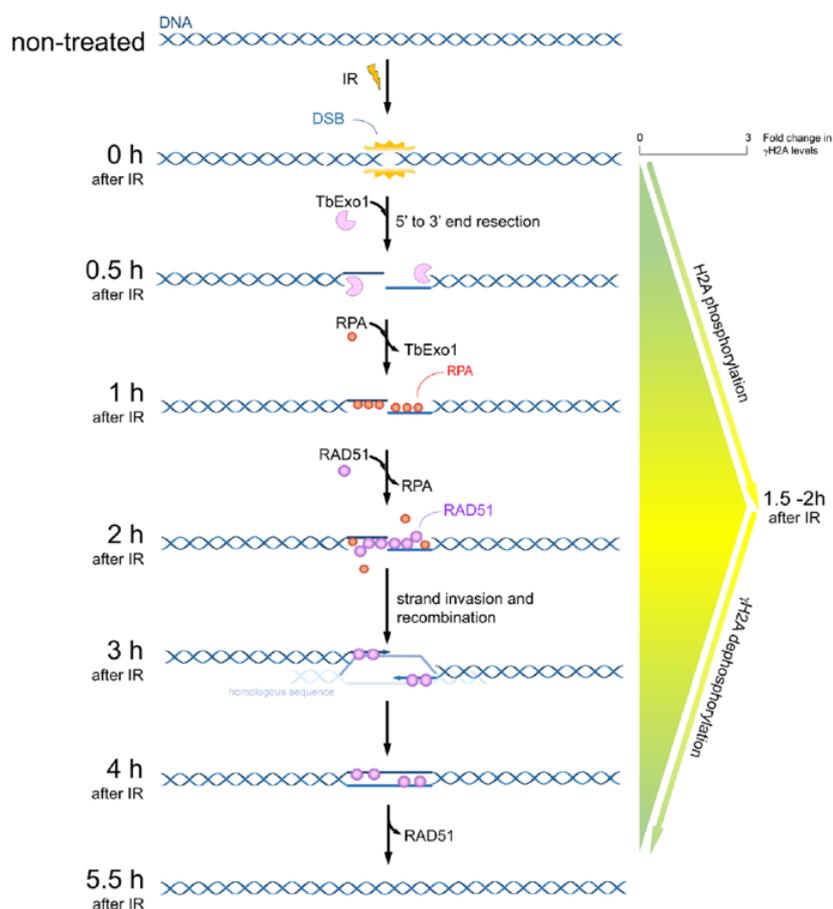


Figura 4.10- Modelo para a cinética de recrutamento de proteínas de reparo da via HR após IR. Nas formas procíclicas de *T. brucei*, a exposição a IR promove o recrutamento para o DNA de algumas proteínas da via de HR após o DSBs. O processo completo de reparo de DNA mediante essa via leva aproximadamente 5.5 horas.

CAPÍTULO II

4.2 *As quinases ATM e ATR tem funções diferenciadas na resposta a danos gerados pela IR em T. brucei*

Como discutido na introdução, durante um ciclo de divisão celular típico de uma célula eucariótica são ativados uma série de mecanismos de *checkpoint* do ciclo celular. Nos mamíferos estas vias de *checkpoint* são governadas pelas proteínas quinases ATM e ATR. A ATM é estimulada por agentes que induzem quebras de cadeia dupla de DNA (DSBs) tais como radiação ionizante e ATR é ativado em resposta à presença de quebras de cadeia simples de DNA e outros fatores de estresse replicativo como a hidroxureia e a radiação UV. Além disso, ATR também é recrutada para os sítios de DSB, auxiliando nesta resposta. Nos tripanosomatídeos, embora danos no DNA ativem um mecanismo de reparo, o papel detalhado das quinases PI3KK nessa resposta não está bem estabelecida. Nesse capítulo do trabalho nós investigamos o papel das quinases ATM e ATR das formas procíclicas do *T. brucei* frente a quebras no DNA geradas pela radiação ionizante (IR), com ênfase no *checkpoint intra-S*.

4.2.1 Efeitos dos inibidores de quinases na viabilidade celular do *T. brucei*

Uma vez que a seletividade dos inibidores usados nos nossos ensaios foi provada contra alvos específicos em mamíferos; ATMi (KU55933, IC50:13nM, *Sigma Aldrich*) e ATRi (VE821, IC50:15nM, *Sigma Aldrich*), nós primeiro ajustamos o tratamento com os inibidores das quinases, para ver o efeito de diferentes concentrações no crescimento celular. Para isso, submetemos as culturas de parasitas a diferentes doses de inibidores específicos (KU55933) e (VE821) com o objetivo de encontrar a dose máxima que inibe o crescimento celular ao longo do tempo, sem levar rapidamente a morte, indicando a máxima resposta dos parasitas frente ao inibidor (107). Nós observamos fenótipos de resposta dos parasitas frente aos inibidores (KU55933 de 10 a 50 μ M; VE821 de 5 a 50 μ M) em faixas de concentrações usadas também na *Leishmania* (107), onde foi observado que 40 μ M de ambos os inibidores induziu a quiescência das culturas.

Diferente ao observado na *Leishmania*, os ensaios de viabilidade da Figura 4.11, mostraram que 20 μM de KU55933 (ATMi) e 5 μM de VE821 (ATRi) conseguiram inibir o crescimento celular dos parasitas ao longo do tempo.

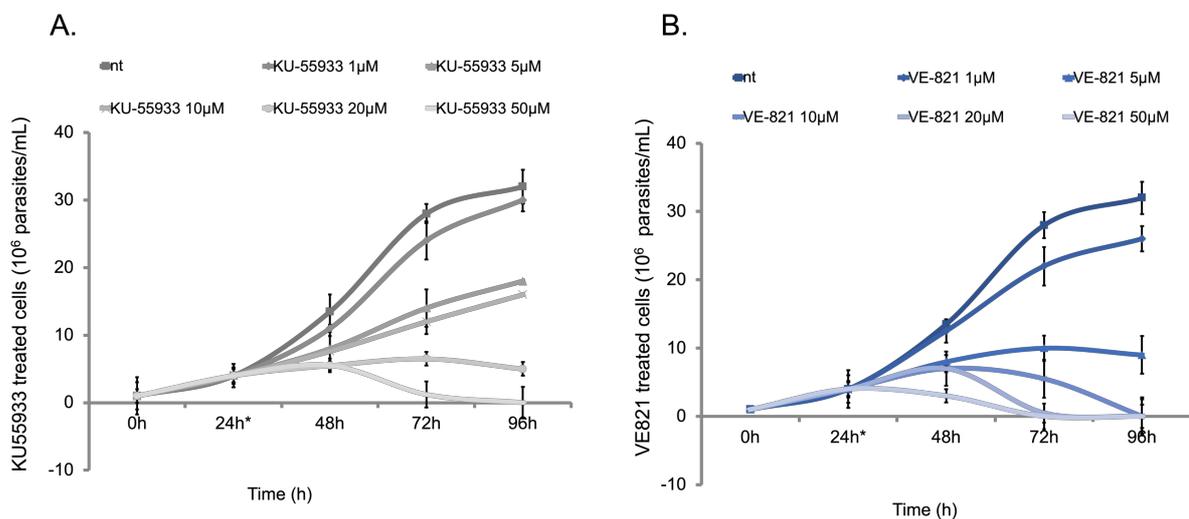


Figura 4.11- Reversibilidade celular após o tratamento com inibidores das quinases ATM e ATR.

O gráfico mostra o crescimento celular a cada 24 h até 96 h após a exposição das culturas a diferentes doses dos inibidores específicos das quinase ATM (KU55933) e ATR (VE821). Os dados representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão.

4.2.2 Controle de transição das fases do ciclo celular mediadas pelas quinases ATM e ATR em resposta a DSB

Para confirmar os dados acima, neste trabalho nós desenvolvemos uma metodologia para avaliar as transições das fases do ciclo celular G1-S, intra-S e S-G2, mediante um ensaio de co-deteção de análogos de timidina. O ensaio de co-deteção foi padronizado para as formas procíclicas da linhagem Lister 427 do *T. brucei* e as condições estabelecidas durante a reação de deteção, e seus respectivos controles, estão apresentados na Figura 4.12.

Para o ensaio de monitoramento do ciclo celular após tratamento com IR, parasitas em crescimento exponencial foram incubados com um primeiro pulso de iodo-desoxiuridina (IdU) por 30 min, com o objetivo de marcar a população de parasitas que estivessem replicando o seu DNA nesse momento.

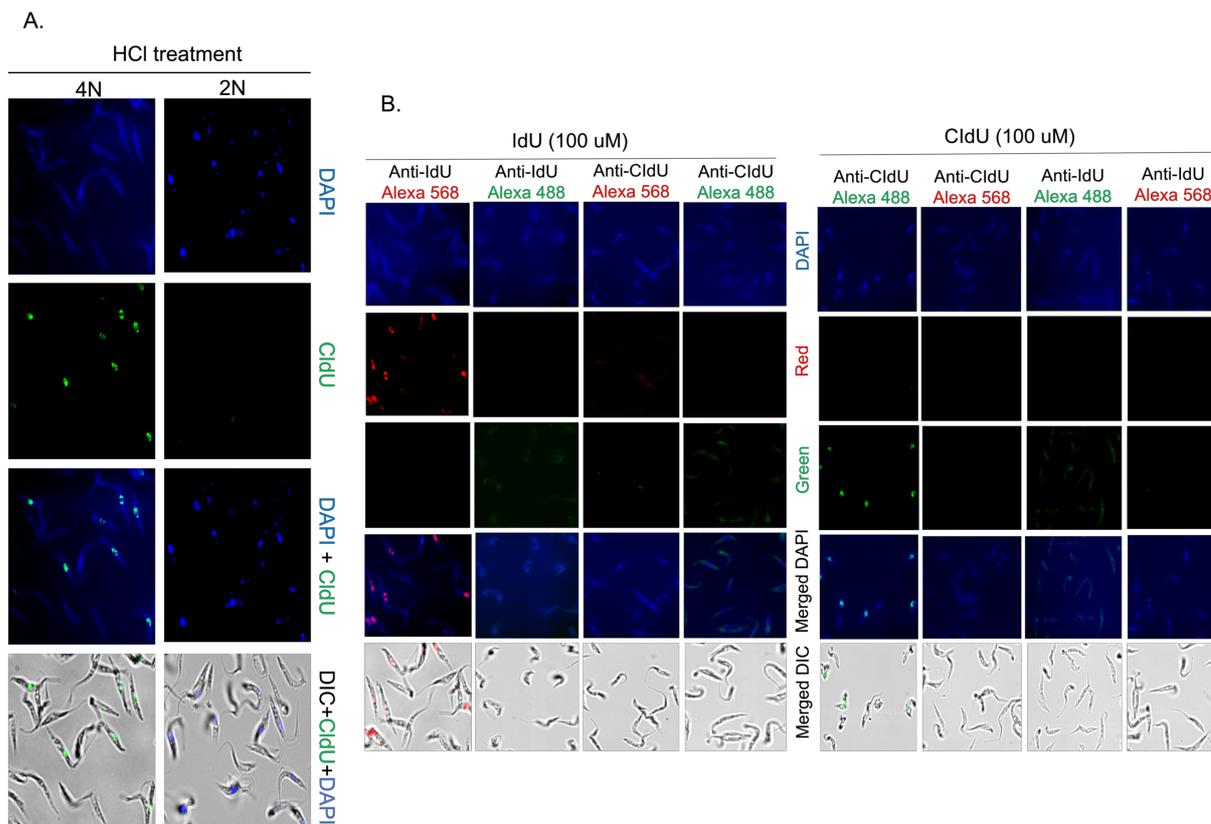


Figura 4.12- A co-deteção de análogos da timidina é específica. (A) Formas procíclicas de *T. brucei* 427 foram tratadas com HCl 2N ou 4N para a detecção do análogo CldU incorporado. (B) Teste de especificidade de anticorpos secundários: como demonstrado na figura, não há detecção cruzada entre os anticorpos usados no experimento. O anticorpo secundário para um análogo da timidina não apresenta nenhuma detecção com o anticorpo primário para o outro análogo (*i.e.*, o análogo de timidina IdU incorporado e detectado com o anticorpo primário α -IdU (mouse) e o anticorpo secundário específico Alexa 568 α -mouse).

Após o primeiro pulso, os parasitas foram lavados e amostras foram coletadas a cada hora durante 6 horas. Cada amostra foi então mantida em um segundo pulso de cloro-desoxiuridina (CldU) por mais 30 min. Após o segundo pulso os parasitas foram imunodetectados sob as nossas condições padronizadas utilizando anticorpos específicos. Durante a imunofluorescência, nós detectamos o seguinte padrão de parasitas marcados (Figura 4.13A, box): i) parasitas vermelhos: parasitas que estavam na fase S durante o 1º pulso (IdU) e na fase G2 durante o 2º pulso (CldU); ii) parasitas amarelos: foram parasitas que estavam na fase S durante o 1º pulso e na fase S durante o 2º pulso e iii) parasitas verdes: foram parasitas que estavam na fase G1 durante o 1º pulso e na fase S durante o 2º pulso (Figura 4.13B). As células marcadas com cada padrão acima foram quantificadas e representadas mediante

gráfico de barras de forma percentual segundo o total de células analisadas em cada caso (Figura 4.13C).

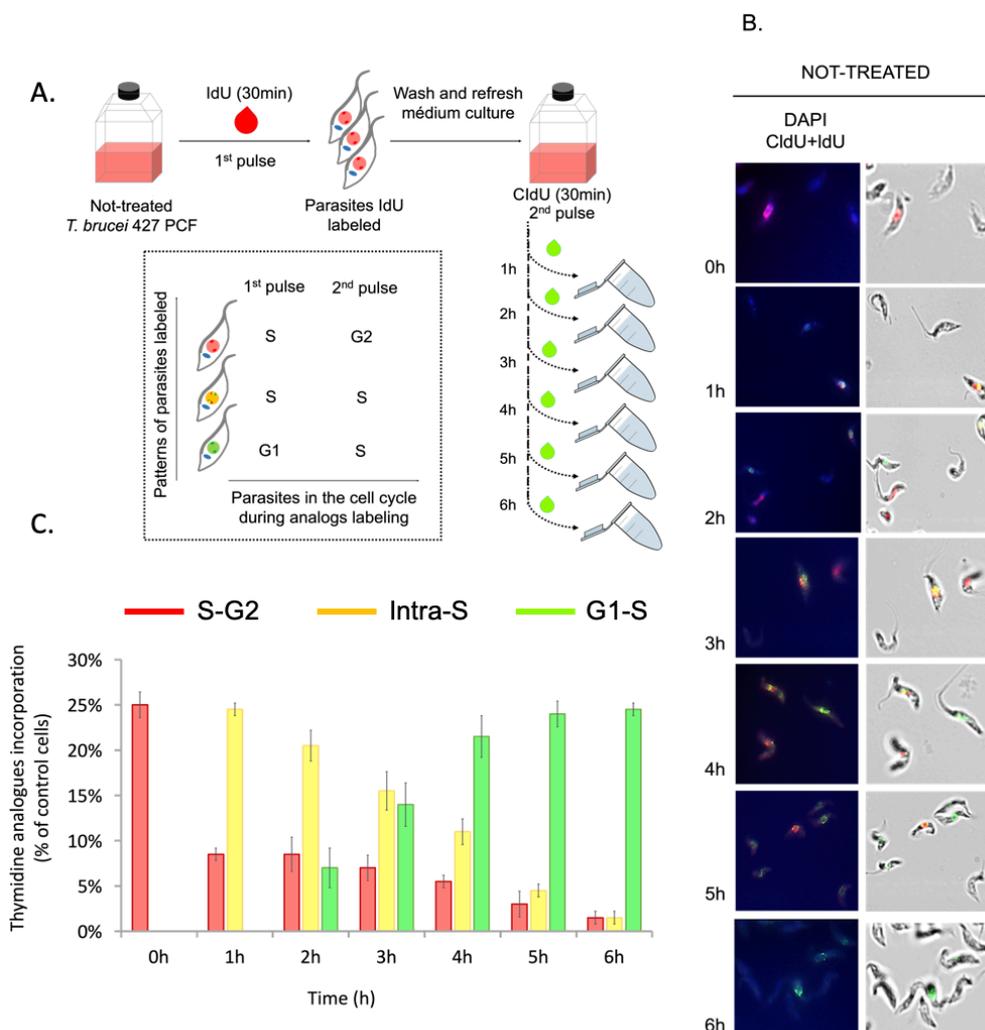


Figura 4.13- Avaliação do ciclo celular de *T. brucei* mediante a co-deteção de análogos de timidina. (A) Esquema mostrando os passos primários do ensaio padronizado para o monitoramento da transição das fases do ciclo celular. O quadrado relaciona o padrão correlacionado com as fases do ciclo celular na qual os parasitas estavam durante cada pulso. (B) Imagens da co-deteção de análogos de timidina em parasitas controle usando IIF. Parasitas durante a fase S do ciclo celular incorporam os análogos IdU e/ou CldU no seu DNA. Os análogos são imunodetectados com anticorpos específicos e aparecem como vermelho (IdU), verde (CldU) e amarelo ambos os análogos (IdU e CldU). (C) Gráfico de barras representando a porcentagem de parasitas marcados em vermelho, amarelo ou verde em diferentes momentos durante o período de monitoramento. Os dados representam a média de três ensaios independentes, cada uma consistindo em n = 300 células analisadas.

Para estudar os efeitos dos mecanismos de *checkpoint* nas transições de fases G1-S, intra-S e S-G2 do ciclo celular em resposta a danos no DNA, nós realizamos o

ensaio acima, mas expondo as células a tratamento com IR após o primeiro pulso (IdU) (Figura 4.14A). Após a co-deteção, as células irradiadas exibiram um atraso pronunciado da população de parasitas na passagem pela fase S (parasitas amarelos), assim como também na transição da fase G1 para a fase S (parasitas verdes) sugerindo a ativação de um mecanismo que bloqueia os parasitas no intra-S (*checkpoint* intra-S) e na transição G1-S (*checkpoint* G1-S) após lesões no DNA com IR (Figura 4.14B, D). Os primeiros parasitas transitando no intra- S (parasitas em amarelo) foram detectados as 3 h e passando da fase G1 para a fase S (parasitas em verde) as 4 h após o tratamento com IR (Figura 4.14B, C).

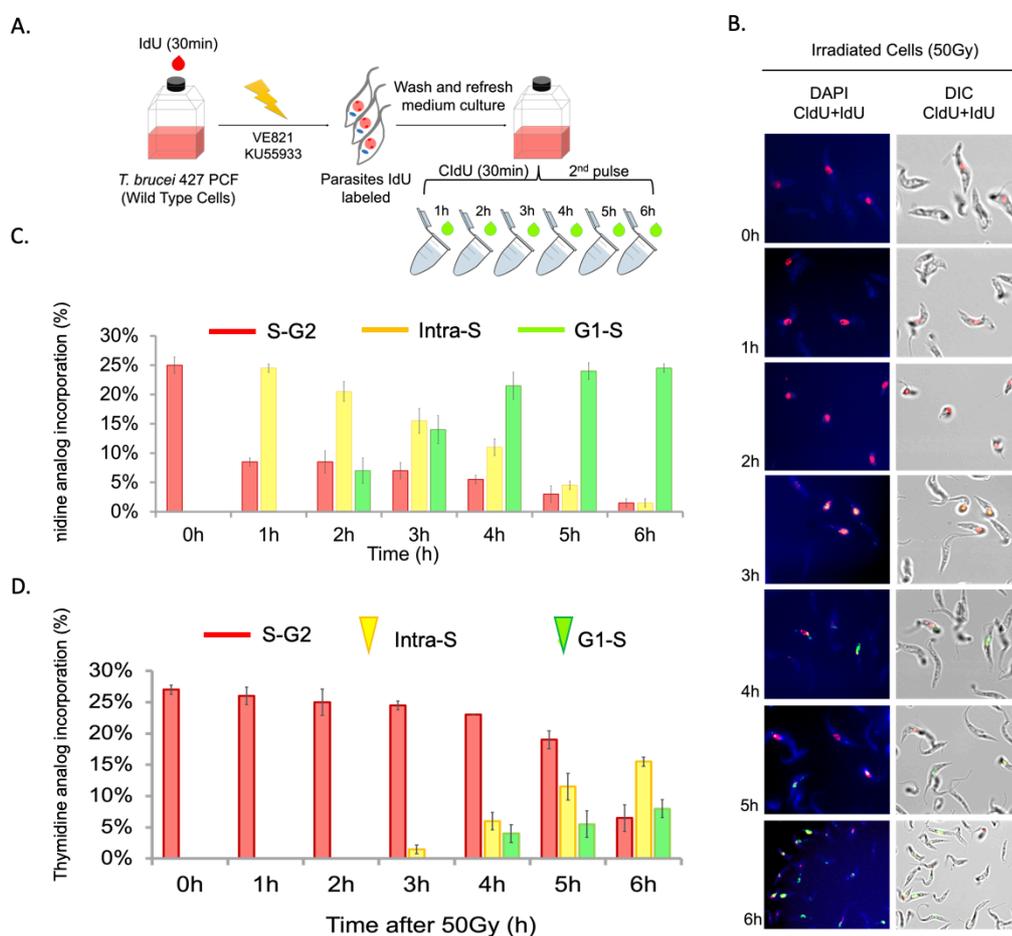


Figura 4.14- Controle da transição das fases do ciclo celular após IR. (A) Esquema mostrando o ensaio desenvolvido para estudar o papel das quinases em *T. brucei* PCF. (B) Imagens da co-deteção de análogos de timidina em parasitas irradiados usando IIF. (C e D) Gráfico de barras representando a porcentagem de parasitas (não expostos – C ou expostos a IR – D) marcados em vermelho, amarelo ou verde em diferentes momentos durante o período de monitoramento do ciclo celular. Os dados representam a média de três ensaios independentes, cada uma consistindo em n=300 células analisadas.

4.2.3 A quinase ATM tem papel no controle da transição G1-S e intra-S em resposta a DSB

Para avaliar o papel das quinases ATM e ATR na transição das fases no ensaio anterior, o nosso próximo passo foi usar inibidores específicos das quinases nas culturas para atuarem antes e depois da exposição à radiação ionizante durante um período de 6 h, com o objetivo de inibir tanto a detecção do dano ao DNA quanto os mecanismos de transdução do sinal após o dano. Após a co-deteção, foi observado um importante papel da ATM em controlar a passagem dos parasitas na transição da fase G1 para a fase S, evidenciado pela detecção precoce de parasitas marcados em verde (Figura 4.15A e C, parasitas em verde a 1 h após dano) quando comparados com as células irradiadas (Figura 4.15B, parasitas em verde a 4 h após dano).

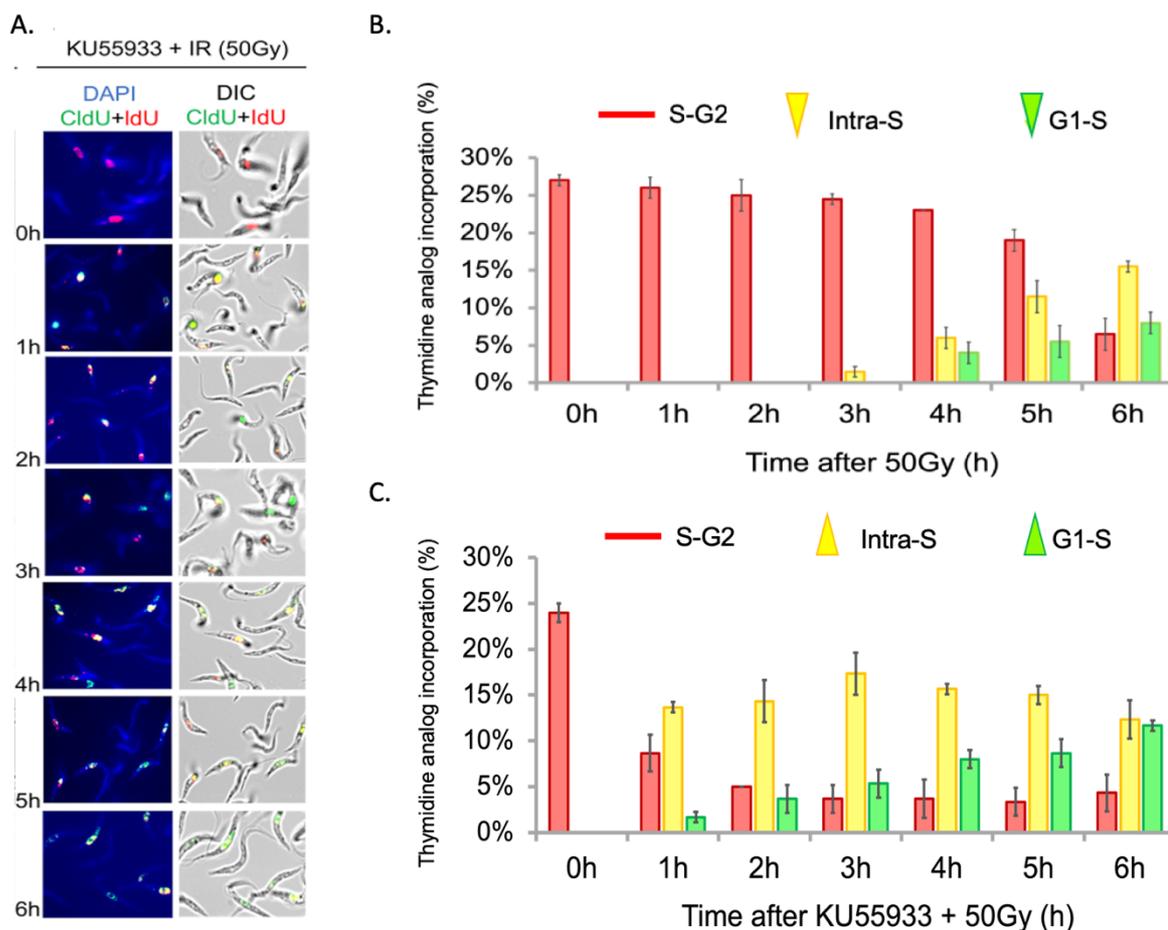


Figura 4.15- Papel da ATM no controle da transição das fases do ciclo celular após IR. (A) Imagens da co-deteção de análogos de timidina em parasitas controle usando IIF. (B e C) Gráfico de barras representando a porcentagem de parasitas irradiados (na ausência – B ou na presença de inibidor de ATM – C) marcados em vermelho, amarelo ou verde em diferentes momentos durante o período de monitoramento do ciclo celular.

A quinase ATM Também mostrou um papel no bloqueio dos parasitas no intra-S após a exposição a IR, já que parasitas ATMi conseguiram retomar a replicação em seguida ao dano (parasitas amarelos) (Figura 4.15C, parasitas em amarelo a 1 h após dano).

4.2.4 A quinase ATR tem papel no controle da transição intra-S em resposta a DSB

Em contraste, usando o inibidor, a ATR não mostrou papel na transição G1-S, já que os parasitas em verde foram detectados apenas as 4 h após dano, igual ao observado nas células irradiadas (Figura 4.16B e C). Porém, a ATR exibiu uma função predominante em controlar a passagem dos parasitas dentro da fase S, uma vez que, na ausência de ATR, nós observamos uma grande quantidade de parasitas em amarelo já as ~1 h após tratamento com IR (Figura 4.16A e C).

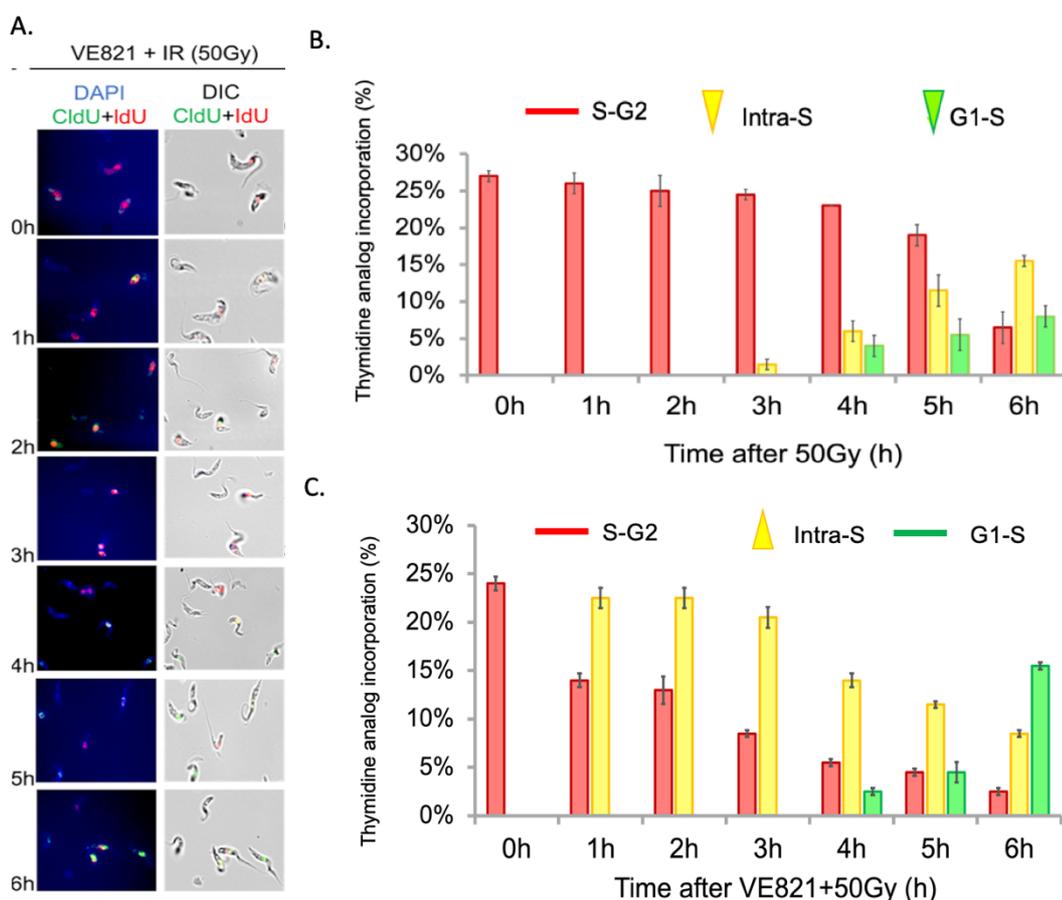


Figura 4.16- Papel da ATR no controle da transição das fases do ciclo celular após IR. (A) Imagens da co-deteção de análogos de timidina em parasitas controle usando IIF. (B e C) Gráfico de barras representando a porcentagem de parasitas irradiados (na ausência – B ou na presença de inibidor de ATR – C) marcados em vermelho, amarelo ou verde em diferentes momentos durante o período de monitoramento do ciclo celular.

Os dados acima, do papel da ATR no controle da transição de fases do ciclo celular, foram também analisados em uma linhagem de células com o gene ATR silenciadas por RNAi. Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Igor Cestari (*Center for Infectious Disease Research em Seattle, EUA*). Nessas células, nós realizamos o mesmo ensaio apresentado acima em: células não induzidas para RNAi e em células induzidas sem e com exposição a radiação ionizante. É importante mencionar que parasitas apenas com a ATR silenciada (Figura 4.17A e B) incorporam mais análogos de timidina (Figura 4.17D) do que aqueles expressando ATR (Figura 4.17C) (Figura 4.13D), sugerindo uma importante função da ATR em regular a velocidade da replicação através da fase S.

Portanto, uma desregulação de ATR durante o ciclo celular normal do *T. brucei* afeta a passagem adequada de parasitas através da fase S. Quando o ensaio é realizado com exposição a IR, vemos que na linhagem silenciada para ATR o *checkpoint* intra-S não funciona (ver aumento de células amarelas a 1h na Figura 4.17F). Este dado é o mesmo obtido em células expostas a IR na presença do inibidor de ATR (Figura 4.16C). Na presença de IR em células silenciadas para ATR vemos ainda uma modulação negativa do *checkpoint* G1-S, já que as células entram em S 3 h após IR nas células interferidas (células verdes, Figura 4.17F). Esse dado não foi observado no ensaio utilizando inibidor de ATR (Figura 4.16C), talvez pelo fato que a linhagem interferida tenha mais ATR comprometido do que as células tratadas com o inibidor. Assim, é possível que ATR tenha um papel secundário na modulação da passagem G1/S.

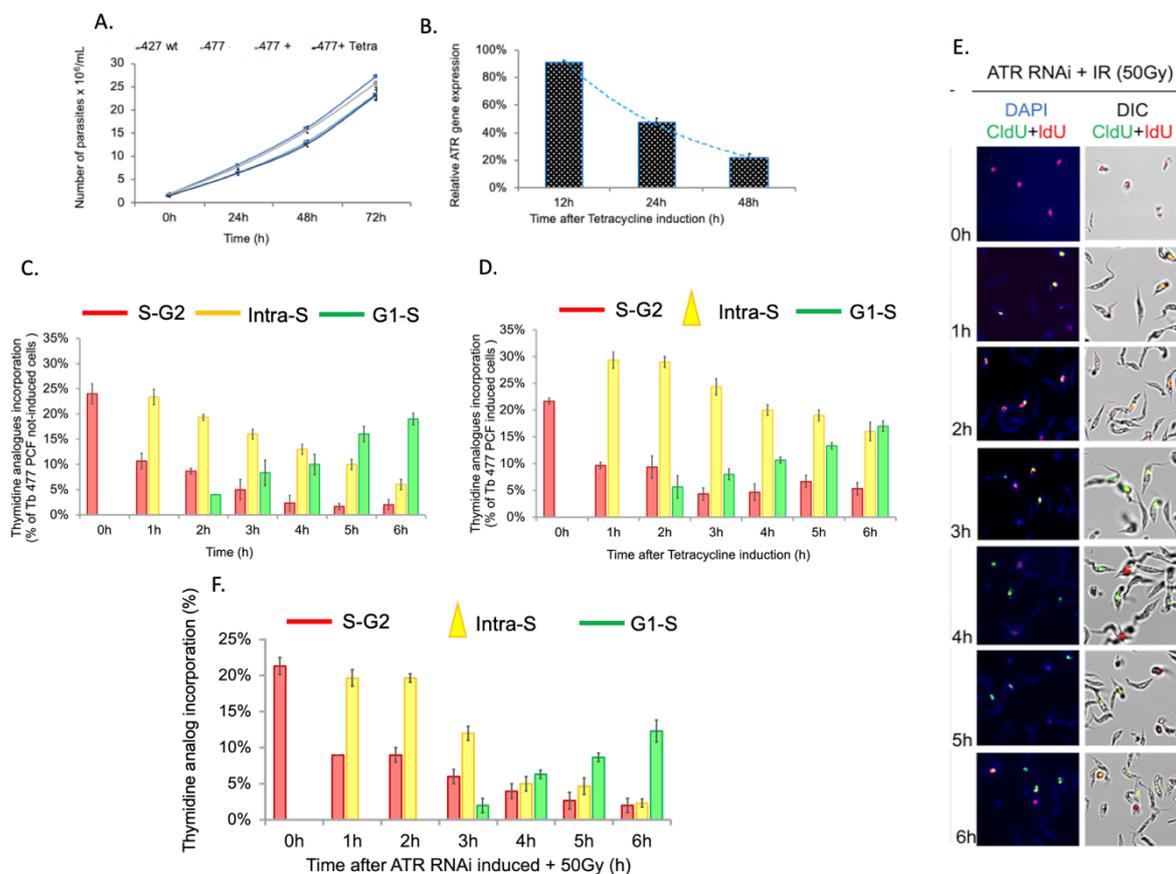


Figura 4.17- Avaliação do *checkpoint* intra-S em células *T. brucei* ATR/RNAi mediante a co-deteção de análogos de timidina. (A) As gráficas de linhas representam a viabilidade dos parasitas durante a indução com tetraciclina. Nos gráficos, 477- (parasitas não selecionados); 477+ (parasitas selecionados com antibióticos); 477 + Tetra (parasitas selecionados e induzidos com tetraciclina). Os dados representam a média de três ensaio independentes e as barras representam o desvio padrão. (B) qRT-PCR do ensaio de indução do silenciamento do gene ATR até 48 h. (C-D) Gráfico de barras representando a porcentagem de parasitas marcados em vermelho, amarelo ou verde em células não induzidas (C) e induzidas com tetraciclina por 48 h (B). (E) Imagens da co-deteção de análogos de timidina em parasitas com a expressão do gene ATR silenciado usando IIF. (F) Gráfico de barras representando a porcentagem de parasitas marcados em células induzidas com tetraciclina por 48 h e expostas a radiação ionizante. Os dados representam a média de três ensaios independentes, cada uma consistindo em n=300 células analisadas e as barras de erro representam o desvio padrão.

4.2.5A quinase ATR tem papel no controle da saída de G2 em resposta a DSB

Nós analisamos o ciclo celular, através de citometria de fluxo, dos parasitas, controle, tratados com inibidor de ATR ou silenciados para ATR, durante 6 h após exposição a IR. Na presença do inibidor de ATR, ou do silenciamento de ATR, os parasitas foram-se acumulando levemente na fase G2/M após o dano, evidenciado pelo aumento do pico G2/M no perfil da citometria de fluxo e na quantificação dos

padrões N/K (Figura 4.18D-E e M-N) . Assim, ATR é importante para que as células passem de G2 após exposição a IR, provavelmente devido ao seu envolvimento no processo de HR.

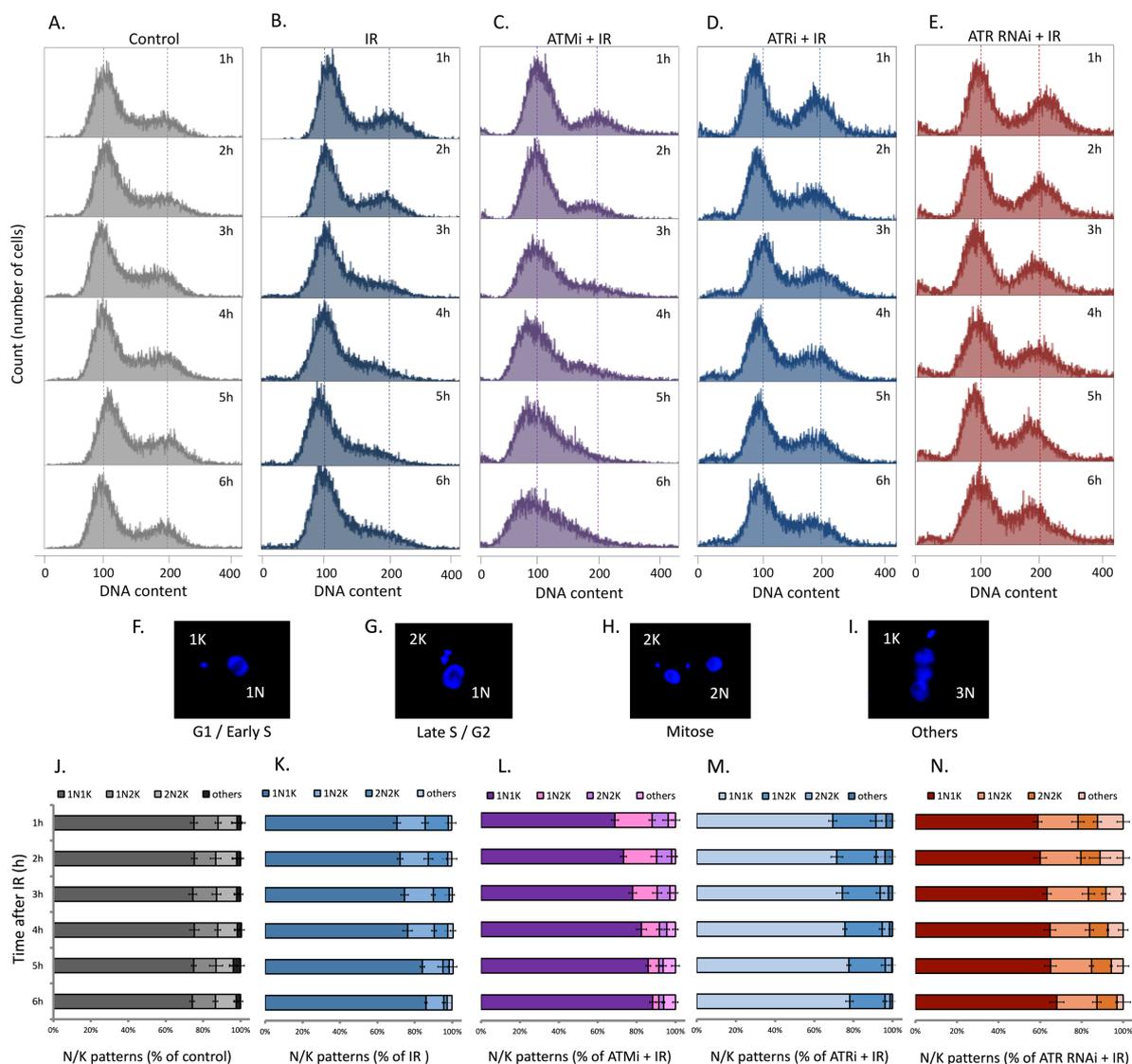


Figura 4.18- Análise de conteúdo de DNA de *T. brucei* PCF após IR na presença de inibição da atividade das quinases ATM e ATR. (A-E) Análise do conteúdo de DNA após o IR (50 Gy). Cinza: células não tratadas. Azul escuro: células *wild-type* irradiadas. Roxo: células *wild-type* ATMi (20 μ M). Azul: células *wild-type* ATRi (5 μ M). Laranja: células ATR/RNAi. (F-I) Padrões morfológicos de N/K representativos nas formas procíclicas de *T. brucei* 427 através da microscopia de tinção com DAPI. (J-N) Quantificação dos padrões morfológicos N/K. Os dados representam a média de três experimentos independentes, cada um consistindo de n=300 e as barras de erro representando o desvio padrão.

4.2.6 A cooperação entre PI3KK regula o crescimento celular em resposta a DSBs no *T. brucei*

Para investigar um papel cooperativo entre ATM e ATR no *T. brucei* em resposta a DSBs na regulação do crescimento celular, nós realizamos um ensaio de viabilidade celular usando inibidores das quinases ATM e ATR na presença de IR e monitoramos o crescimento celular ao longo do tempo (Figura 4.19). Nós confirmamos que na exposição a radiação ionizante o crescimento celular é de fato regulado pelas quinases ATM e ATR (Figura 4.19 IR and ATRi, IR and ATMi). No entanto, na ausência das duas quinases (Figura 4.19 IR, ATRi and ATMi) nós observamos que o crescimento celular continua bloqueado. Neste ponto nós especulamos que em resposta a IR existe um outro mecanismo assegurando o crescimento dos parasitas na ausência da ATM e da ATR na exposição a IR, governado provavelmente pela ação de uma outra proteína do tipo PI3KK. Alternativamente, é possível que as concentrações dos inibidores de ATM e ATR não tenham sido suficientes para assegurar completamente as vias de sinalização tendo ainda um basal que bloqueia o crescimento celular neste ensaio.

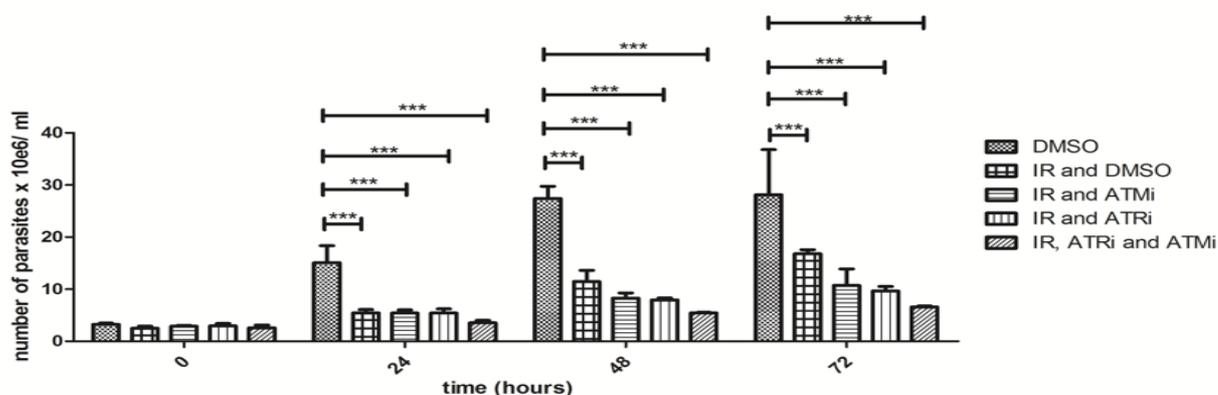


Figura 4.19- A cooperação entre PI3Ks regula o crescimento celular no *T. brucei* em resposta a DSBs gerados pela IR. Gráficos de barras representando a viabilidade celular de *T. brucei* PCF após diferentes tratamentos. Parasitas tratados com DMSO como controle. Parasitas foram tratados ou não com 50 Gy de IR, na presença de inibidores: 10 μ M de KU55933 (ATMi) e 2.5 μ M de VE821 (ATRi) ou ambos simultaneamente (ATMi e ATRi). Gráfico de barras representativo da média de quatro experimentos independentes (+/- Derivação padrão: SD). Anova de duas vias +/- SD. Pós-teste de Bonferroni: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Em conjunto, os dados até aqui indicam (i) que o reparo de DSBs pela via HR acontece nas fases *lateS/G2*; (ii) uma função importante da ATM e uma função secundária de ATR coordenando a transição G1-S (G1 *checkpoint*), (iii) uma função

das duas quinases em regular a passagem pelo intra-S (*checkpoint*) após IR e (iv) papel de ATR na saída de G2. Além disso foi observada a possível participação de uma outra PI3KK em regular o crescimento celular de *T. brucei* em resposta a IR.

4.2.7 O empacamento de forquilhas, sua recuperação e o controle da velocidade da replicação são funções da ATR durante o *checkpoint* intra-S.

Como nós observamos um *checkpoint* intra-S em *T. brucei*, nós decidimos investigar em maior detalhe este processo de modulação da replicação após DSBs. Como em modelos eucariontes ATR é a principal quinase que governa o *checkpoint* intra-S regulando o alongamento das forquilhas de replicação e o disparo de novas origens após danos no DNA e como nós mostramos que ATR é a quinase envolvida no *checkpoint* intra-S em *T. brucei*, nós realizamos o ensaio de *DNA combing* em células *wild type* e em células com a expressão do gene ATR silenciada. Para investigar o papel da ATR no alongamento das forquilhas, foram realizados dois pulsos assimétricos usando diferentes análogos de timidina $1^{stPulse}$ IdU (7 min) e $2^{ndPulse}$ CldU (21 min) para calcular o factor de alongamento da forquilha de DNA (DFEF). DFEF foi calculado como o comprimento do $2^{ndPulse}$ do análogo CldU dividido pelo comprimento do $1^{stPulse}$ do análogo IdU ($2^{ndPulse} / 1^{stPulse}$) (Figura 4.20).

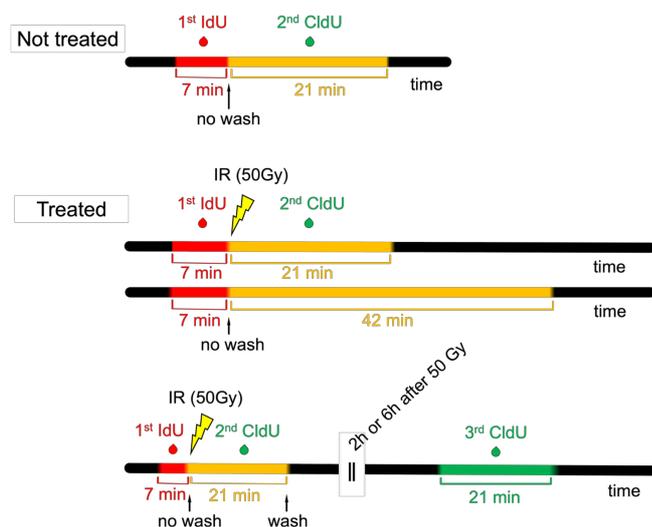


Figura 4.20- Esquema representativo do ensaio de *DNA combing* para avaliar o empacamento das forquilhas de replicação após IR. Esquema mostrando o ensaio de DNA combing realizado em células não tratadas e tratadas com IR. O fator de alongamento (DFEF) foi estimado pela razão ($2^{ndPulse} / 1^{stPulse}$). Pulsos assimétricos com dois análogos diferentes foram realizados $1^{stPulse}$ IdU (7 min) e $2^{ndPulse}$ CldU (21 min). A retomada das forquilhas de replicação após IR foi analisada usando um $3^{rdPulse}$ CldU (21 min) as duas e seis horas após o dano por IR.

Nas células controle, o valor do DFEF variou de 2 a 6, com um valor médio de ~3 (dado esperado se o alongamento não está comprometido, já que o segundo pulso foi três vezes maior que o primeiro), em um total de 20 moléculas inteiras de DNA analisadas (Figura 4.21, ponto laranja). Nas células irradiadas, nós observamos uma diminuição no fator DFEF (0.9) indicando um encurtamento das forquilhas de replicação após dano, devido provavelmente a um processo de empacamento da forquilha. Tal diminuição no DFEF nas células irradiadas foi observada também durante um segundo ensaio onde as células foram mantidas em um pulso de CldU durante 42 min após IR (Figura 4.21, pontos azuis). Os dados indicam que as forquilhas de DNA foram de fato empacadas e o fenótipo observado não é consequência apenas de uma diminuição na velocidade de replicação.

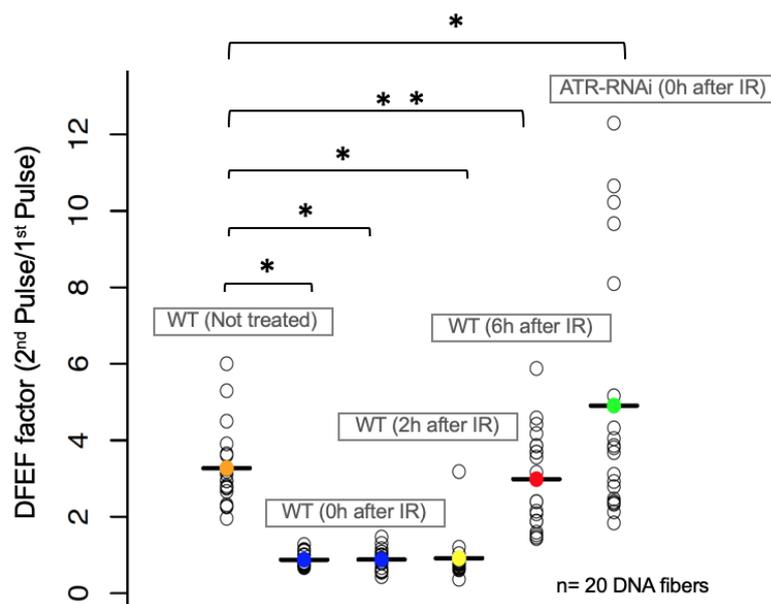


Figura 4.21- Fator de alongamento de forquilhas de replicação (DFEF) em *T. brucei* após IR.

Gráficos de pontos representando o fator de alongamento (DFEF) dos casos analisados. Para o cálculo do DFEF, foi usado o fator de alongamento ($1 \mu\text{M} = 2\text{kb}$) na configuração do *software ImageJ Fiji*. Os dados representam um total de ($n = 20$) moléculas de DNA esticadas para cada caso analisado. (*) Indica diferenças significativas em relação às células não tratadas segundo os testes de *Friedman* e *Wilcoxon*. Ponto laranja: Células não tratadas (1^{st} pulse (7min) + 2^{nd} pulse (21min)). **Parada da forquilha de replicação.** Pontos azuis: células *wild-type* irradiadas (1^{st} pulse (7min) + IR + 2^{nd} pulse (21min)) ou (1^{st} pulse (7min) + IR + 2^{nd} pulse (42min)). **Retomada da forquilha de replicação.** Ponto amarelo: células *wild-type* irradiadas (1^{st} pulse (7min) + IR + 2^{nd} pulse (21min) + 3^{rd} pulse (21min) 2h após IR). Ponto vermelho: (1^{st} pulse (7min) + IR + 2^{nd} pulse (21min) + 3^{rd} pulse (21min) 6h após IR) Ponto verde: células ATR/RNAi irradiadas (1^{st} pulse (7min) + IR + 2^{nd} pulse (21min)).

Nós estimamos o tempo que leva o processo de *checkpoint* para ativar o empacamento das forquilhas. Para tanto, nós estimamos primeiro a velocidade média da replicação de *T. brucei* usando a seguinte fórmula baseada nos dados das células controle: $(\sum_1^{20} \text{yellow length from control cells} / 20) / \text{time of CldU pulse}$, a qual foi calculada em 5.63 kb/min (Este dado é semelhante ao já obtido no laboratório (108)). Depois, nós calculamos o comprimento médio das forquilhas empacadas na Figura 4.21B, pontos azuis. Assim, dividindo o valor do comprimento médio das forquilhas empacadas pela velocidade de replicação de células controle, nós estimamos que o tempo médio para o parasita ativar a resposta que leva ao empacamento das forquilhas de replicação após dano é ~11,46 min.

Após analisar o efeito do *checkpoint intra-s* no empacamento das forquilhas, nós estudamos também o processo de recuperação após o reparo do DNA. Para isso, nós calculamos novamente o valor de DFEF as 2 e 6 h após o tratamento com IR. Nós observamos uma recuperação completa das forquilhas de replicação de DNA as 6 h após tratamento (Figura 4.21, ponto vermelho) com um valor DFEF similar às células não tratadas (**). Para entender o processo de recuperação do alongamento da forquilha de replicação, nós analisamos os padrões de fluorescência obtidas nas lâminas de *DNA combing* e observamos que a recuperação das forquilhas empacadas acontece via a recuperação unidirecional (Figura 4.22A, *i.e.*, forquilhas b, f ou s). Vimos também que a replicação pode ser recuperada mediante o disparo de uma nova origem de replicação na região próxima ao ponto de empacamento (Figura 4.22A, *i.e.*, forquilhas g, k, n ou q).

Para verificar o papel de ATR no processo de empacamento de forquilhas, nós repetimos o experimento em células com a expressão do gene ATR silenciada. Diferente das células *wild type*, nas células ATR silenciadas nós não observamos o processo de empacamento das forquilhas de replicação após a exposição a IR (Figura 4.22B, *i.e.*, forquilhas e, l, o, ou q). Além disso, nós observamos um importante aumento no comprimento das forquilhas de replicação e, conseqüentemente, um aumento no DFEF (5.97) em comparação com células *wild type* irradiadas (2.91) (Figura 4.21, ponto verde e ponto laranja).

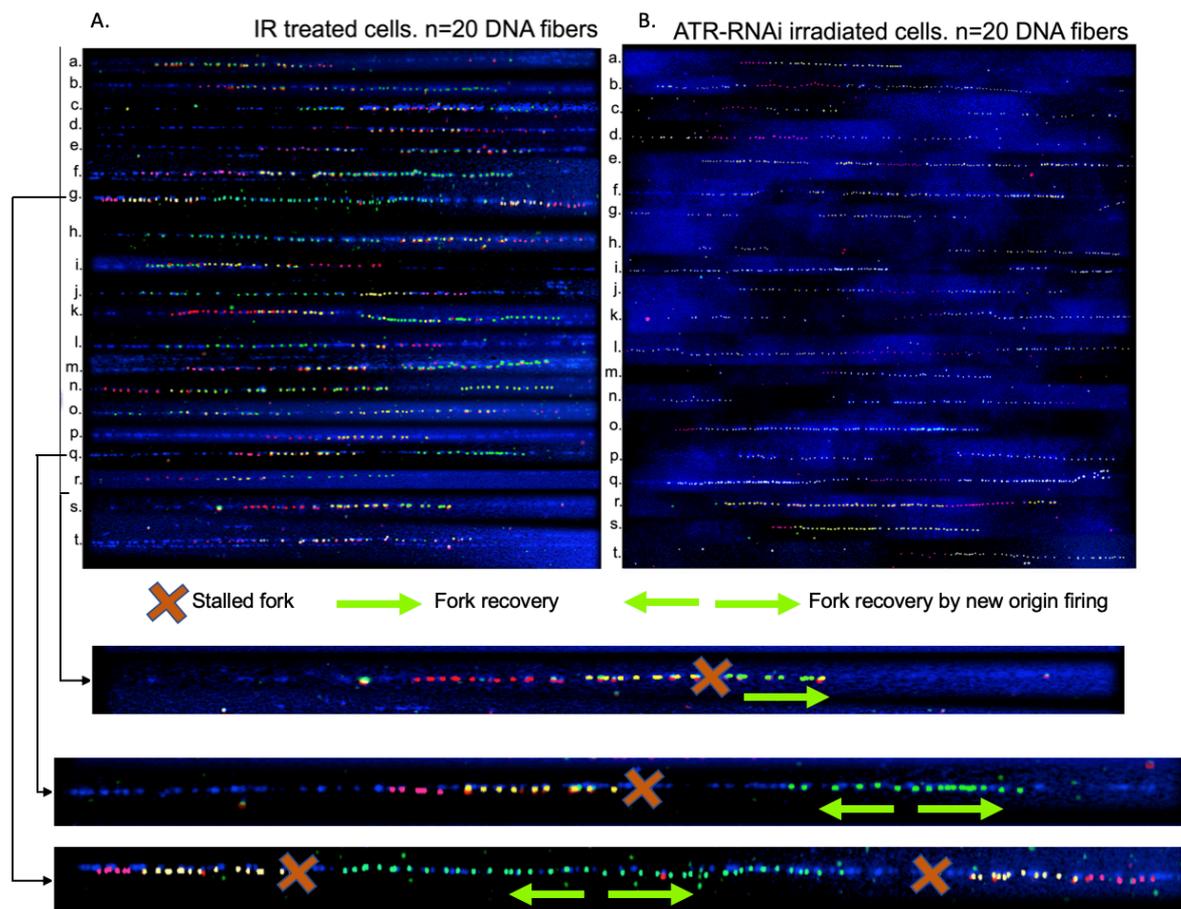


Figura 4.22- DNA combing revela empacamento das forquilhas de replicação de DNA e a sua recuperação dependente da ATR após IR. (A-B) Painéis de imunodeteção das moléculas de DNA a partir de células controle (A) e ATR/RNAi (B). Cada painel mostra o total de moléculas de DNA esticadas usadas para estimar o fator DFEF. As moléculas em zoom representam os padrões observados para a recuperação das forquilhas de replicação. Tem um exemplo mostrando a recuperação da forquilha via forquilha estabilizada (A-s) e via o disparo de uma origem de replicação *backup* (B-g,q).

Cabe notar que o painel da Figura 4.22B, está em uma escala duas vezes menor que o painel da Figura 4.22A, isto porque as moléculas incorporadas foram entre 2 a 3 vezes maiores (~770kb) quando comparadas com o comprimento das moléculas de DNA irradiadas de células controle (~263kb). Além disso, na Figura 4.22B a maioria das moléculas foram encontradas com as extremidades quebradas (Figura 4.22B, *i.e.*, forquilhas e ou r) evidenciado pela ausência na detecção do anticorpo contra DNA simples fita (Figura 4.22B, faixas azuis). Por essa razão, o painel de microscopia das células ATR/RNAi aparecem com um efeito de *back-ground* azul no fundo da lâmina.

Para saber se o tamanho aumentado das moléculas na Figura 4.22B poderia ser devido ao aumento na velocidade da replicação, nós calculamos a velocidade das forquilhas de replicação de células não exposta a IR com a ATR silenciada e comparamos com células *wild type*. Na Figura 4.23 nós observamos que de fato a ausência *per se* da ATR afeta a velocidade da replicação das forquilhas, o que explicaria em parte o tamanho maior das moléculas incorporadas com análogos de timidina observado no nosso ensaio com IR (Figura 4.23).

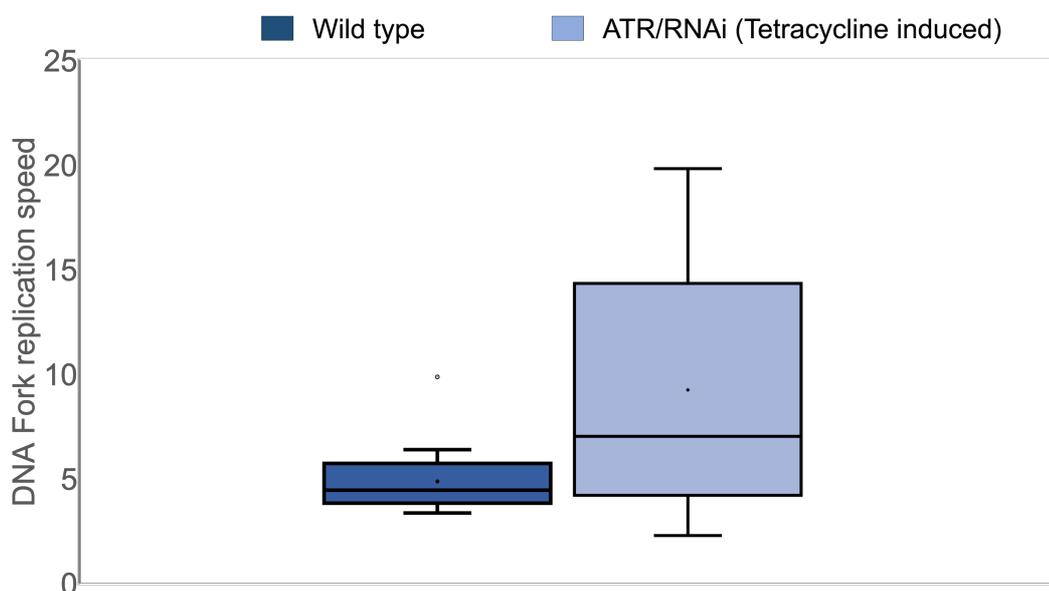


Figura 4.23- Velocidade das forquilhas de replicação em parasitas *wild type* e com a expressão da ATR silenciada.

4.2.8A regulação de proteínas de reparo da via HR também é uma função da ATR.

Como nós mostramos que (i) ATR participa da saída da célula de G2 e (ii) em G2 ocorre o reparo de HR, nós avaliamos se a regulação de alguns atores importantes da via de reparo HR eram afetados na ausência da ATR. Para isso nós realizamos ensaios de IIF das proteínas de reparo gH2A, a RPA e a RAD51 na presença e na ausência da ATR após tratamento com IR.

Nós primeiro estudamos a fosforilação do importante marcador de quebra de DNA gH2A. Como mostrado no capítulo I (Figura 4.2B), o padrão de gH2A espalhada foi detectada também à 1 h após IR e a diminuição do sinal de fosforilação 5 h após o tratamento nas células controle (Figura 4.24 A,C WT+50Gy). Porém, quando a ATR foi inibida ou silenciada, nós observamos um padrão de fluorescência diferente, onde

um primeiro pico positivo aconteceu 1 h, mas um segundo pico de fluorescência espalhada apareceu 5 h após o tratamento com IR (Figura 4.24 A,C WT+VE821+50Gy e ATR/RNAi+50Gy).

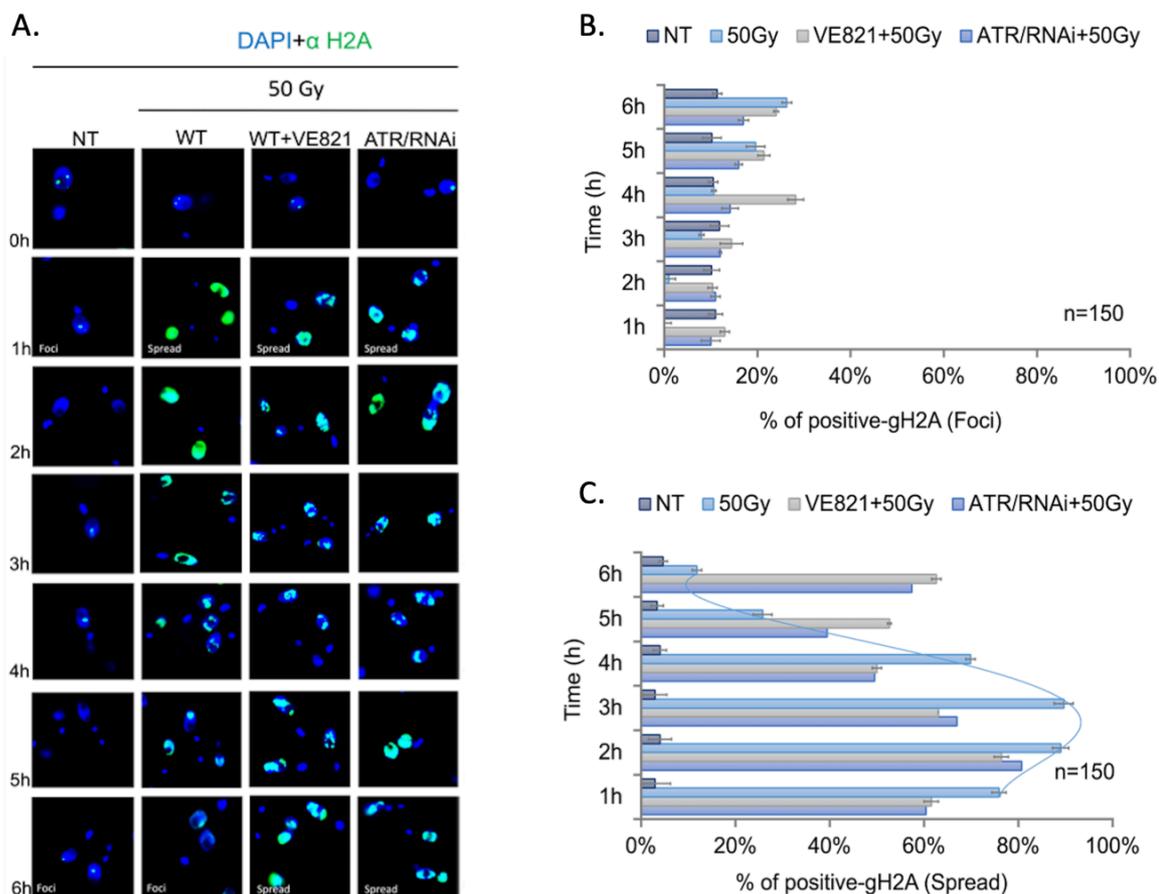


Figura 4.24- A fosforilação da histona H2A é regulada de forma diferente na ausência da ATR após IR. (A) Imunodeteção da gH2A utilizando anti-soro específico. (B-C) Quantificação dos padrões de imunofluorescência da gH2A observados no núcleo, na forma de focos ou espalhados. Os dados representam a média de três ensaios independentes, cada um consistindo de n = 150. As barras de erro representam o desvio padrão.

Além disso, após tratamento com IR a RPA2 mostrou um padrão de imunofluorescência positiva espalhada de 1 h as 5 h nas células controle (Figura 4.25WT+50Gy), mas na ausência da ATR esse padrão espalhado foi perdido (Figura 4.25A WT+VE821+50Gy e ATR/RNAi+50Gy).

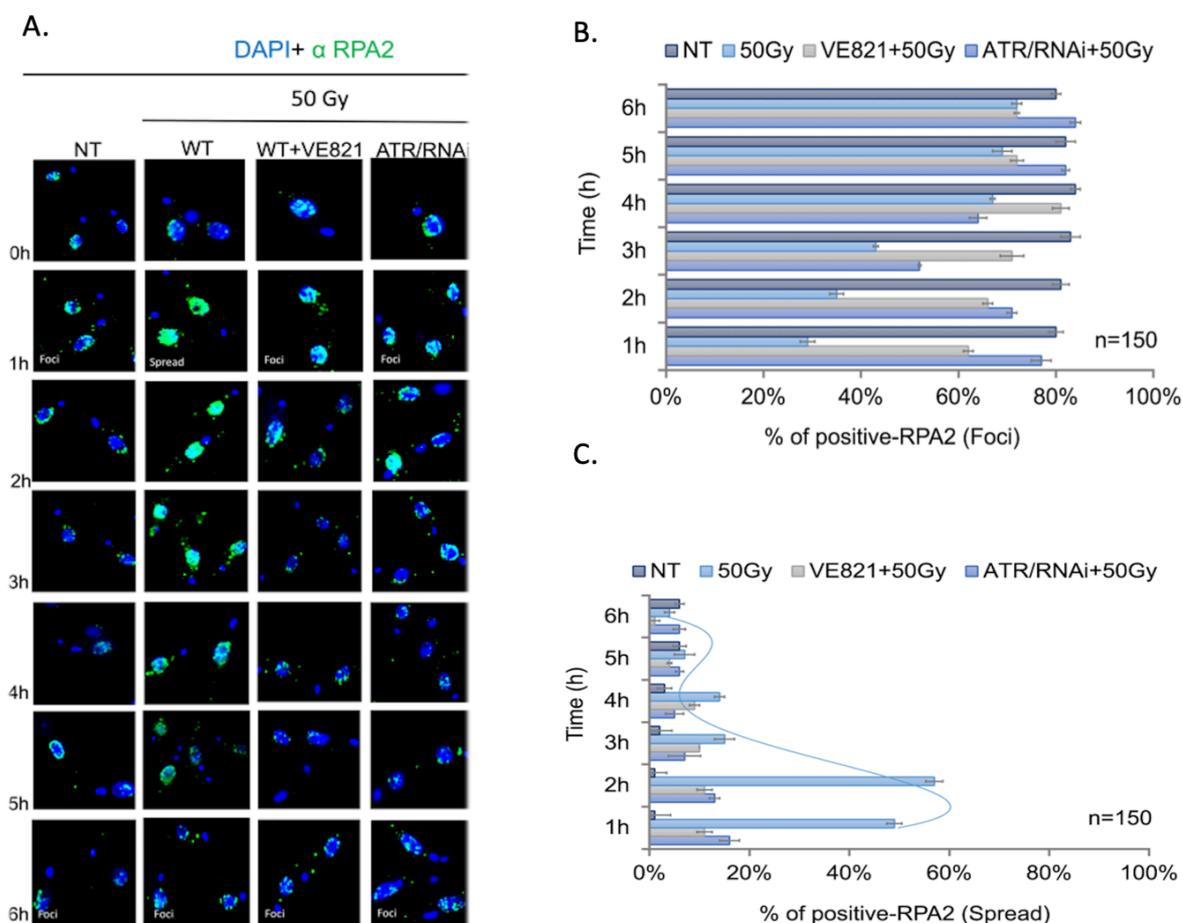


Figura 4.25- A proteína de reparo RPA2 é desregulada na ausência da ATR após IR. (A) Imunodeteção da proteína RPA2 utilizando anti-soro específico. (B-C) Quantificação dos padrões de imunofluorescência da RPA2 observados no núcleo, na forma de focos ou espalhados. Os dados representam a média de três ensaios independentes, cada um consistindo de n=150. As barras de erro representam o desvio padrão.

Finalmente, não foi observado nenhum padrão de imunofluorescência positiva espalhada (Figura 4.26A,C) nem nenhum sinal de imunodeteção por *western blot* (Figura 4.26D-E) da proteína de reparo RAD51. Neste ponto nós sugerimos que: na ausência da ATR e após tratamento com IR a proteína RPA de ligação a simples fita não é recrutada corretamente para o núcleo. Em consequência, também não é recrutada a proteína recombinase RAD51 (Figura 4.26 D-E). A ausência de HR devido a falta de RAD51 poderia ser uma razão para explicar o padrão espalhado de gH2A observado 5 h após IR.

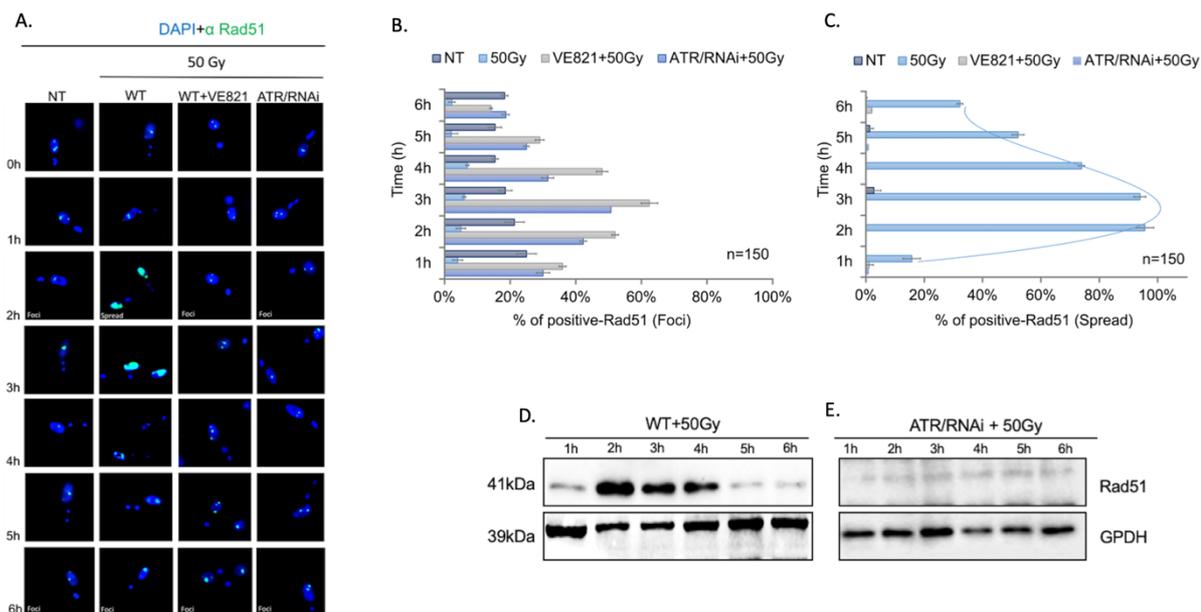


Figura 4.26- A proteína de reparo RAD51 é desregulada na ausência da ATR após IR. (A) Imunodeteção da proteína RAD51 utilizando anti-soro específico. (B-C) Quantificação dos padrões de imunofluorescência da RAD51 observados no núcleo, na forma de focos ou espalhados. Os dados representam a média de três ensaios independentes, cada um consistindo de n=150. As barras de erro representam o desvio padrão. (D-E) *Western blot* de extratos totais de proteína a partir de células *wild type* e com a expressão de ATR silenciada após tratamento com IR. A detecção da GPDH foi usada como controle de loading.

Os dados acima mostram uma participação da ATR na resposta a quebras de dupla fita de DNA no *T. brucei* após tratamento com IR coordenando: i) a velocidade das forquilhas de replicação, ii) a parada da replicação via o empacamento das forquilhas de replicação, e iii) a regulação da expressão e recrutamento de proteínas de reparo importantes da via HR.

4.2.9 Considerações finais do Capítulo II

Nós resumimos os dados mais importantes obtidos nos capítulos I e II na Figura 4.27. Após DSBs gerados pela IR, pontos de *checkpoint* são ativados para interromper o ciclo celular coordenados pelas quinases tripanosomais ATM e ATR. ATM mostrou um papel principal em controlar a transição G1-S e intra-S, enquanto a ATR exibiu funções no *checkpoint intra-S*, bem como na regulação de proteínas de reparo relevantes da via HR. Além disso, é possível que exista a participação de uma outra PI3KK regulando o crescimento celular dos parasitas em resposta a IR junto com a

ATM e a ATR. Alguns processos *downstream* a ativação de ATR também estão indicados na figura.

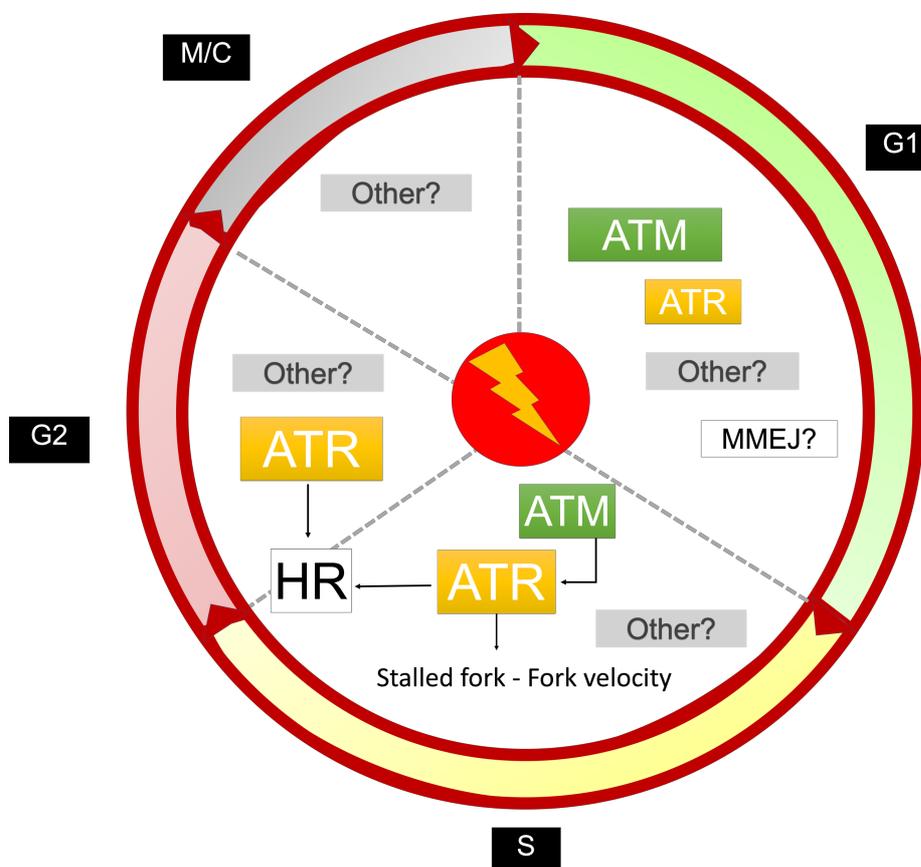


Figura 4.27- Modelo da ativação de mecanismos de *checkpoint* e reparo de DNA no *T. brucei* PCF após tratamento com radiação ionizante. Após IR, formas procíclicas do *T. brucei*, ativam uma resposta a quebras no DNA que inclui a ação diferenciada das quinases ATM e ATR, e dos mecanismos de reparo de quebras de dupla fita de DNA dependendo das fases do ciclo celular. Parasitas na fase G1 durante a exposição a IR, ativam uma via de sinalização dependente de ATM que controla a passagem pela transição G1/S com a ajuda da ATR. Nessa fase foi hipotetizado que o reparo de quebras de dupla fita de DNA acontece pela via MMEJ, que leva um tempo maior a 6 h para concertar os danos ao DNA. Parasitas na fase S durante o dano ativam uma via de sinalização dependente da ATR que envolve: a regulação da velocidade da replicação e a parada das forquilhas de replicação. ATR também mostrou um papel importante em regular a passagem dos parasitas pela fase G2 após exposição a IR e na regulação de importantes proteínas de reparo da via HR que é a via de reparo predominante das fases *lateS/G2*.

CAPÍTULO III

4.3 *O bloqueio das quinases ATM e ATR sensibilizam o Trypanosoma brucei frente a ação da droga pentamidina*

Como comentado na introdução, a doença de HAT gambiense na fase aguda é tratada com a droga pentamidina como quimioterápico de primeira linha. A pentamidina é uma diamidina aromática utilizada desde 1940 e, na maioria dos casos, o tratamento é bem-sucedido devido à sua toxicidade seletiva para parasitas, evitando as células hospedeiras. Este composto liga-se fortemente aos sítios ricos em AT (109) do sulco menor do DNA do parasita, o que confere a sua potência tripanocida (110-112). Os minicírculos dos cinetoplastos dos tripanossomas são particularmente ricos em AT e, portanto, são o alvo preferencial para as diamidinas que destroem o genoma mitocondrial conhecido como cinetoplasto (111). Porém, há relatos mostrando que células da forma sanguicola do parasita sem cinetoplasto permaneceram sensíveis à ação da pentamidina, o que levou a trabalhos mostrando que a droga se acumula nos tripanossomas a concentrações milimolares (113-115) e que, conseqüentemente, a atividade tripanocida da pentamidina é o resultado de múltiplos efeitos deletérios, em diferentes alvos além do cinetoplasto (116). As diaminas também foram observadas no núcleo dos tripanossomas, afetando as interações DNA-proteína, prejudicando a síntese e o metabolismo do DNA (117), no entanto, nenhum trabalho tem mostrado a ação detalhada da pentamidina no DNA nuclear.

Assim, nesta última fase do trabalho, nós decidimos verificar se a pentamidina pode causar DSB do DNA nuclear e, em caso positivo, se o uso de inibidores de ATM e ATR poderiam contribuir com a ação tripanocida da pentamidina.

4.3.1 Busca do IC50 da pentamidina nas formas procíclicas

Nosso primeiro passo foi estimar os efeitos de diferentes doses da droga pentamidina na viabilidade celular do parasita (Figura 4.28). Nós observamos que a concentração que inibiu 50% da proliferação do parasita foi IC50: 0.4 nM.

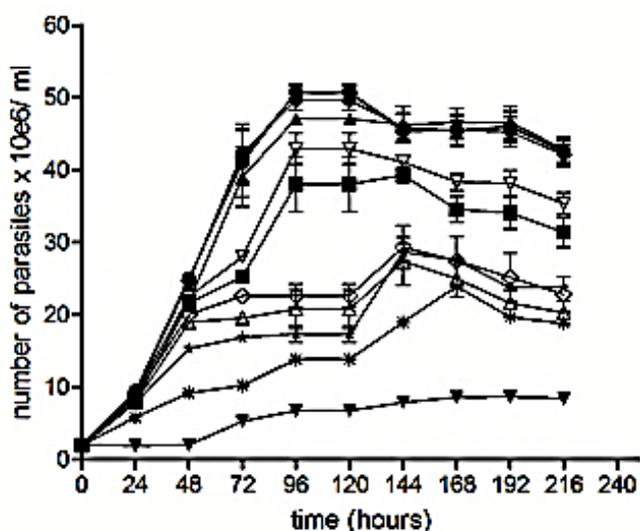


Figura 4.28- Curvas de proliferação das formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* na presença de pentamidina. Curvas de proliferação representativas de três experimentos independentes na presença de diferentes concentrações de pentamidina: círculo negro: parasitas tratados com DMSO (controle); triângulo preto para baixo: 300 de Memantina (controle de inibição); diamante negro: pentamidina 0.001 nM; círculo preto: pentamidina 0.002 nM; quadrado preto: pentamidina a 0.005 nM; triângulo aberto: pentamidina 0.0125 nM, triângulo aberto apontando para baixo: pentamidina 0.025 nM; diamante aberto: pentamidina 0.05 nM, estrela negra: pentamidina 0.2 nM; asterisco: pentamidina 0.5 nM.

4.3.2 A pentamidina gera quebras no DNA e promove fosforilação da gH2A nas formas procíclicas do *T. brucei*

Para investigar se as vias de *checkpoint* do ciclo celular sob o controle das quinases ATM e ATR contribuem para a ação da pentamidina nas formas procíclicas do *T. brucei*, nós avaliamos primeiro se a pentamidina gerava quebras no DNA. Para isso, nós submetemos uma cultura de parasitas a IC50 da pentamidina e monitoramos as quebras no DNA mediante a marcação de terminais quebrados pelo TUNEL e a detecção do marcador gH2A fosforilado. A Figura 4.29A, mostrou fragmentação do DNA a partir de 2 h após tratamento com pentamidina. Concomitantemente, nós observamos a presença do marcador gH2A na microscopia de imunofluorescência, sugerindo uma via de *checkpoint* ativada em resposta a pentamidina (Figura 4.29B).

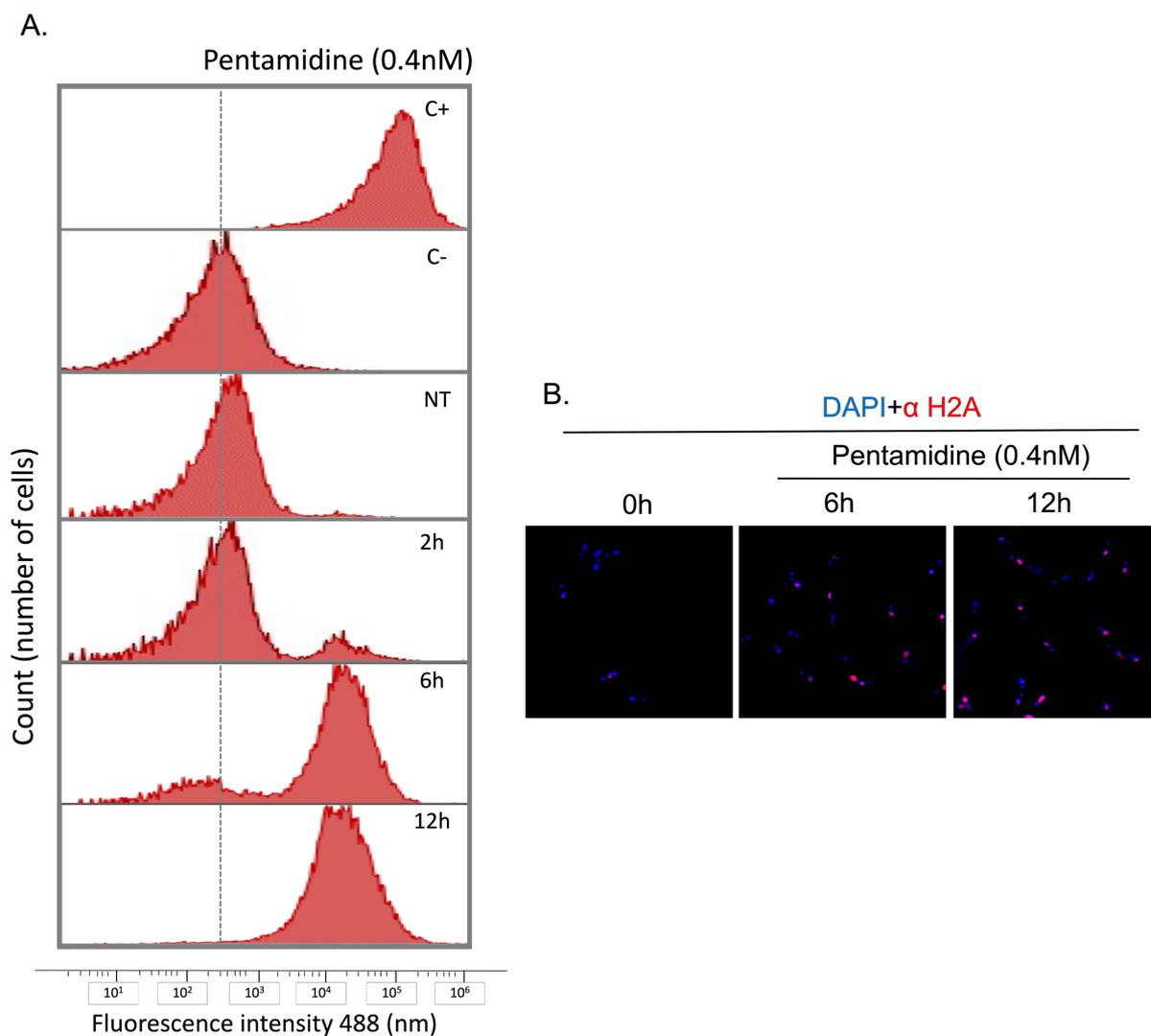


Figura 4.29- A pentamidina gera quebras de dupla fita de DNA no *T. brucei* PCF. (A) Citometria de fluxo do ensaio de (TdT-TUNEL). C(+) representa amostras pré-tratadas com DNase I, gerando assim o máximo de intensidade positiva no ensaio de TUNEL. C(-) representa o controle negativo quando a enzima TdT não estava presente. A linha pontilhada foi usada para indicar o pico que indica fluorescência negativa. Portanto, o pico à direita da linha pontilhada foi considerado TUNEL positivo. (B) Imunodeteção do marcador gH2A após tratamento com pentamidina.

4.3.3 A inibição de vias de *checkpoint* no *T. brucei* potencializa o efeito da pentamidina via DSBs persistentes

Em seguida, nós avaliamos o que acontece com a DSBs ao longo de 48 h de tratamento com pentamidina na presença dos inibidores de ATM, ATR ou ambos os inibidores juntos. O ensaio de TUNEL revelou que a quantidade de DSB observada 24 h após adição da droga, diminui 48 h após a monoterapia (Figura 4.30B). Porém as quebras de DNA detectadas com o TUNEL foram persistentes, e até em maior

quantidade, quando a droga é adicionada juntamente com os inibidores das quinases, de forma simples ou combinada, sendo o fenótipo mais agravado quando usados ambos os inibidores simultaneamente (Figura 4.30B). Esses dados mostram que a ativação de ATM e/ou ATR é importante para o reparo de DSB gerado pela pentamidina. Na presença dos inibidores a sinalização do dano, e conseqüentemente o processo de reparo, devem ficar comprometidos.

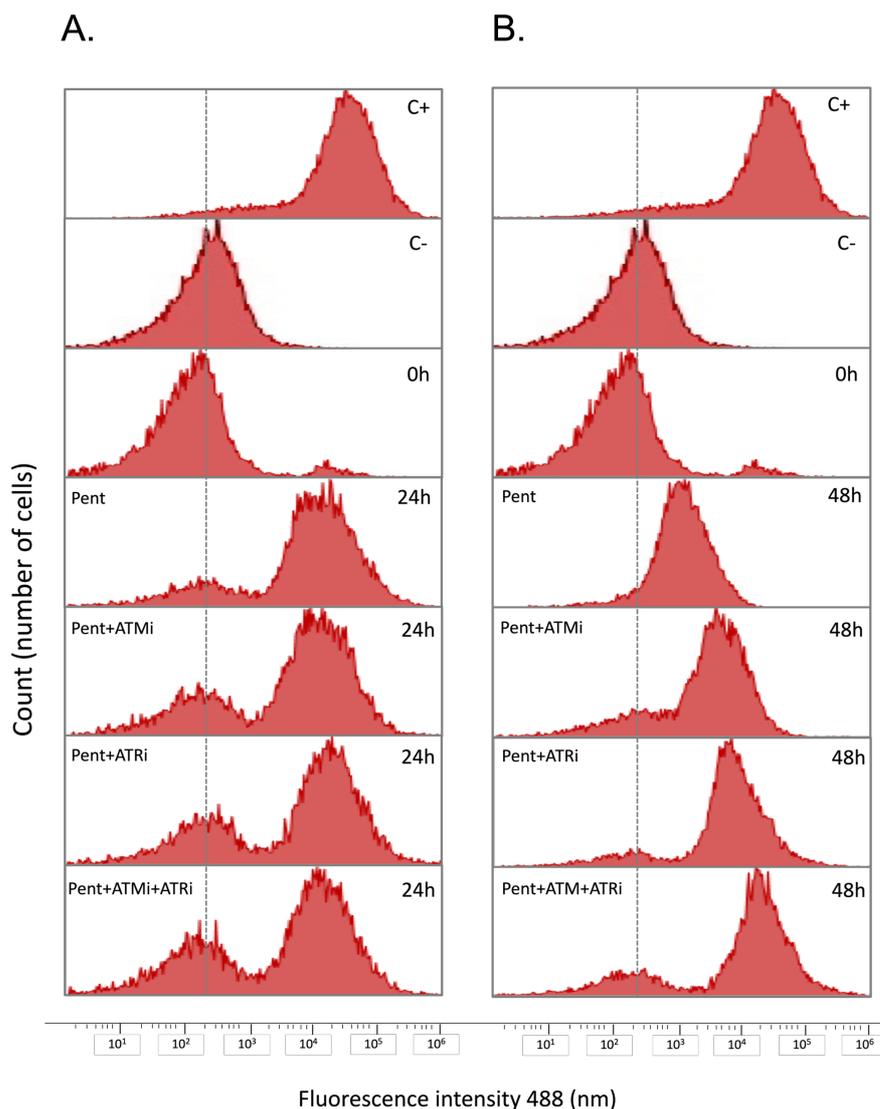


Figura 4.30- A inibição de ATM e ATR potência o efeito da pentamidina mediada por quebras persistentes de DNA não reparadas. (A-B) Citometria de fluxo do ensaio de (TdT-TUNEL). C(+) representa amostras pré-tratadas com DNase I, gerando assim o máximo de intensidade positiva no ensaio de TUNEL. C(-) representa o controle negativo quando a enzima TdT não estava presente. A linha pontilhada foi usada para indicar o pico de fluorescência negativa. Portanto, o pico à direita da linha pontilhada foi considerado TUNEL positivo.

4.3.4 A inibição de ATM e ATR sensibiliza ao *T. brucei* frente a ação da pentamidina

Finalmente, já que DSB gerado por pentamidina é maior na presença de inibidores das quinases ATM e ATR, nós investigamos se a inibição das quinases ATM e ATR poderia sensibilizar os parasitas tratados com pentamidina. Para isso, nós realizamos um ensaio de viabilidade celular usando inibidores das quinases ATM e ATR na presença da pentamidina e monitoramos o crescimento celular ao longo do tempo. Na Figura 4.31 foi observado que os parasitas foram mais sensíveis a pentamidina, quando esta foi usada em combinação com um ou outro inibidor das quinases. O efeito de sensibilização foi ainda maior quando foram usados ambos os inibidores das quinases simultaneamente junto com a pentamidina. Neste caso a parada do crescimento celular foi adiantada, observada 48 h após o tratamento ao invés de 72 h (Figura 4.31, IC₅₀, ATMi and ATRi).

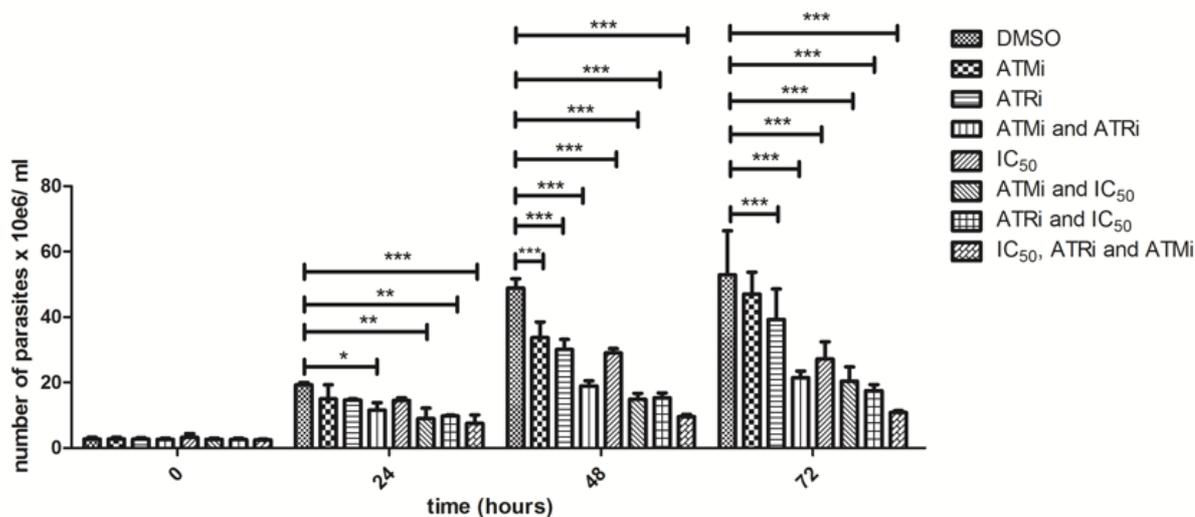


Figura 4.31- A inibição da ATM e ATR sensibilizam o *T. brucei* PCF frente ao tratamento com pentamidina (A) Gráficos de barras representando a viabilidade celular de *T. brucei* PCF após diferentes tratamentos. Parasitas tratados com DMSO como controle. Parasitas foram tratados ou não com 0.4 nM de Pentamidina (IC₅₀) na presença de inibidores: 10 μ M de KU55933 (ATMi) e 2.5 μ M de VE821 (ATMi) ou ambos simultaneamente (ATMi e ATRi). Gráfico de barras representativo da média de quatro experimentos independentes (+/- Derivação padrão: SD). Anova de duas vias +/- SD. Pós-teste de Bonferroni: *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001.

4.3.5 Considerações finais do Capítulo III

Considerando os dados acima, a inibição de ATM e/ou ATR na presença de pentamidina aumenta as DSBs (Figura 4.30B). A parada do crescimento observada no ensaio de viabilidade (Figura 4.31) sugere que existe um, ou mais, *checkpoint(s)* ativado(s) por estes danos de DNA. Esses mecanismos poderiam estar sendo ativados por ATM e/ou ATR que não foi inibida na concentração de inibidores usada, ou, hipótese mais tentadora, por uma terceira PI3KK (já sugerida antes neste trabalho, Figura 4.19) que consegue ativar o *checkpoint* na presença de DSB gerada por pentamidina.

5 DISCUSSÃO

As células eucarióticas desenvolveram uma rede multicomplexa de vias de sinalização envolvidas na resposta a danos no DNA, que incluem vias de sinalização de *checkpoint* para o bloqueio da progressão do ciclo celular e ativação de mecanismos de reparo do DNA para evitar deleções, mutações ou aberrações no material genético durante o processo de divisão celular (85,118,119). Esse mecanismo é essencial em organismos patogênicos ou células tumorais que se replicam a uma taxa muito alta, onde a proliferação é crucial para sobreviver. No contexto do tratamento do câncer, por exemplo, a resposta a danos no DNA pode limitar a eficácia de agentes quimioterápicos citotóxicos e da radioterapia via a ativação dos mecanismos de *checkpoint* de ciclo celular, fornecendo uma via de escape para as células mediante o reparo das lesões do DNA levando à sobrevivência (120). Assim, uma abordagem no tratamento de células com alta taxa de proliferação é o uso combinado das drogas com inibidores de elementos das vias de *checkpoint* de ciclo celular ou de proteínas da maquinaria de reparo de DNA (14-16). Células tumorais ou patógenos do sangue como o *Plasmodium* (121), são bons candidatos para a inibição de vias de *checkpoint* durante a erradicação, já que a proliferação pode atingir taxas mais altas do que as células do hospedeiro (14-16). No caso do *T. brucei*, a ideia de direcionar a quimioterapia contra processos que modulam o ciclo celular do tripanossoma foi previamente discutida por Hammarton *et al.*, (122), porém a ideia de olhar para o parasita como um “tumor do sangue” é uma abordagem recente (14). Nesta, considera-se então a inibição das vias de controle do ciclo celular e de metabolismo do DNA do parasita como o eixo principal da quimioterapia por combinação de drogas. Nesse trabalho nós analisamos o mecanismo de resposta a quebras de dupla fita de DNA ativado nas formas procíclicas do *T. brucei*. Uma vez caracterizada parte desta resposta, no que se refere a ativação de *checkpoints* e processo de reparo de DNA, nós investigamos se a inibição das vias de *checkpoint* do ciclo celular influencia a ação da droga pentamidina. Esta abordagem tem a ambição de abrir o debate sobre como o conhecimento da modulação do ciclo celular pode contribuir para o desenvolvimento de terapias combinadas anti-tripanosossoma.

Nós guiaremos esta discussão apresentando os dados mais importantes do trabalho nos três componentes principais da resposta ativada nas formas procíclicas

do *T. brucei* frente a lesões no DNA gerados pela exposição a radiação ionizante, a saber: i) o controle do ciclo celular governado pelas vias de sinalização de *checkpoint* ativadas em resposta aos danos no DNA e quais as quinases envolvidas, ii) o mecanismo de reparo de DNA ativado no parasita frente as DSBs e o iii) *cross-talk* entre as vias de *checkpoint* e a maquinaria de reparo de DNA ativados. No final, comentaremos sob os impactos desta resposta sobre a sensibilização dos parasitas frente a droga pentamidina.

A radioresistência do *T. brucei*

Poucos estudos têm investigado os efeitos da IR no *T. brucei*, e até hoje nenhum abordou com precisão a radioresistência do parasita (123,124). Nosso resultado mostra que as formas procíclicas do *T. brucei* tem uma radioresistência bem menor que da *Leishmania amazonenses* (125) e que do *T. cruzi* (126), os quais têm valores de radioresistência de 500 Gy e 1500 Gy, respectivamente. A radioresistência nas formas procíclicas do *T. brucei* está mais próxima da dos modelos eucariotos, como a de células-tronco embrionárias humanas ou de diferentes tumores humanos variando entre 1 a 70 Gy (127), o que poderia representar uma vantagem numa abordagem por radioterapia da doença da HAT.

Controle do ciclo celular governado pelas PI3KK tripanossomais ATM e ATR em resposta a DSBs DNA

Já que a finalidade dos mecanismos de resposta a danos no DNA é ativar vias de sinalização que impeçam a progressão do ciclo celular, nós estudamos se o *T. brucei* apresenta mecanismos de resposta frente a DSBs gerados pela IR capazes de deter a progressão do ciclo celular para permitir o reparo. Para isso, nós padronizamos um ensaio de monitoramento das transições das fases do ciclo celular mediante a co-deteção de análogos de timidina (Figura 3.3). O ensaio de monitoramento das fases do ciclo celular mostrou que células do *T. brucei* irradiadas apresentam um bloqueio na síntese de DNA após o tratamento com IR (Figura 4.14C) tanto das células no intra-S como na passagem de G1 para a fase S e que tal bloqueio é liberado as ~3 e 4 h após dano, respectivamente. Então, nós investigamos se as PI3KK do *Trypanosoma* ATM e ATR tinham função nesse bloqueio em resposta a DSBs. Para investigar o

papel das quinases ATM e ATR no processo de *checkpoint*, nós usamos inibidores específicos das quinases ATM e ATR, principais atores que governam as vias de *checkpoint* em mamíferos. Nós usamos inibidores específicos de ATM e ATR previamente caracterizados em mamíferos, KU55933 e VE821, respectivamente. Esses inibidores mostraram ter afinidade pelos sítios catalíticos das quinases ATM e ATR putativas da *Leishmania*, assim como um efeito nas vias de sinalização naturais do parasita e na resposta ao estresse oxidativo (107). Nesse trabalho foi mostrado que as sequências do domínio C-terminal (catalítico) dos tripanosomatídeos tem tamanho e posição semelhantes aos domínios das sequências preditoras.

Durante o ensaio de monitoramento das transições das fases do ciclo celular usando inibidores das quinases ATM Figura 4.15 e ATR Figura 4.16, nós observamos que as quinases tripanossomais desempenham papéis diferenciados na resposta a danos no DNA no *T. brucei*. Como visto em eucariotas superiores (28), a ATM do *Trypanosoma* tem um papel principal no controle do *checkpoint* G1-S em resposta a quebras no DNA já que na sua ausência os parasitas conseguem passar para a fase S, possivelmente com o seu DNA ainda danificado (Figura 4.15B e C, barra verde). Por outro lado, nós observamos um discreto papel da ATR em regular a passagem dos parasitas na transição G1-S (Figura 4.17F). Observamos um papel essencial da ATR Figura 4.16B e também de ATM Figura 4.15B em coordenar a passagem dos parasitas no intra-S após o dano, sugerindo uma resposta cooperativa das quinases como visto em mamíferos (28). Já no *checkpoint intra-S* nós observamos a ATR controlando a velocidade da replicação (Figura 4.23) e o empacamento de forquilhas de replicação (Figura 4.22B). Além do papel da ATR no *checkpoint* G1-S e intra-S, nós observamos um papel de ATR em regular a passagem dos parasitas pelas fases G2-M após tratamento com IR (Figura 4.18).

Mecanismos de reparo do DNA ativado no *T. brucei* frente as DSBs

Uma vez que os tripanosomatídeos parecem não apresentar uma via NHEJ canônica devido à ausência de proteínas principais da via como são a DNA ligase IV e XRCC (128), nós investigamos o recrutamento do outro mecanismo de reparo de DSBs em eucariotos, a via HR após o tratamento com IR. Primeiro nos monitoramos a presença de DSBs após exposição a IR mediante ensaio do TUNEL e a intensidade da fluorescência da gH2A (Figura 4.2). Em células de mamíferos, a histona H2AX é

um marcador clássico de DSBs amplamente usado, já que se sabe que sofre fosforilação rápida nas vias de *checkpoint* em resposta aos DSBs (129-130). No entanto, a variante de histona H2AX não foi descrita em nenhum tripanosomatídeo (98) ou levedura (131). Em vez disso, no *T. brucei*, foi descrita a modificação gH2A como um candidato para desempenhar o papel de gH2AX de mamíferos, aumentando nas formas sanguícola do parasita em estudos *in vivo* em resposta ao dano no DNA (98). Nossos dados mostraram que, como em outros eucariontes (131,132), o *T. brucei* apresenta uma fosforilação da gH2A após DSBs Figura 4.2B. Enquanto os perfis de fragmentação de DNA pelo TUNEL foram positivos durante as primeiras 1.5 horas após IR, e o sinal foi negativo após esse período, a fosforilação da gH2A foi significativamente positiva durante as primeiras seis horas após danos no DNA (Figura 4.2A, B). Para explicar essa aparente discrepância, nós hipotetizamos que, após o IR, o recrutamento rápido da maquinaria de reparo de DNA nas extremidades dos terminais quebrados de DNA impede a atividade da enzima TdT, utilizada no teste de TUNEL, de marcar as pontas do DNA quebradas que ficam cobertas pelas proteínas da maquinaria de reparo. Em relação a gH2A, nós também observamos níveis basais do marcador em cultura de células não tratadas (controle) (Figura 4.2B e Figura 4.8A). Níveis basais de gH2A não tinham sido relatados anteriormente em tripanosomatídeos (125,133,134), exceto em formas sanguícolas do *T. brucei* (98). Semelhante às células procíclicas de *T. brucei*, células humanas malignas (135) mostraram fosforilação constitutiva de H2AX que varia de acordo com as fases do ciclo celular. Nestes estudos, as células nas fases S e G2/M exibiram maiores níveis de fosforilação de H2AX do que células na fase G1 em resposta a DSBs endógenos, que é provavelmente gerado como resultado de estresse replicativo de DNA frente a espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas ao longo do ciclo celular. No entanto, a correlação entre a presença de níveis basais de gH2A em células de *T. brucei* não tratadas e frente a estresse de replicação do DNA requerem investigação adicional.

Considerando que em mamíferos a presença da gH2AX na cromatina pode ser suficiente para iniciar o recrutamento efetivo da maquinaria de reparo das DSBs (66-69) (Figura 1.6), nós estudamos a cinética do recrutamento da maquinaria de reparo de DSBs do parasita como mecanismo ativado em resposta a IR. Desta forma, primeiro analisamos a dinâmica da proteína TbRPA1, uma proteína que participa tanto de processos de metabolismo do DNA quanto da maquinaria do reparo HR em mamíferos. A análise de imunofluorescência indireta revelou que os sinais de TbRPA1

aumentaram ao longo da primeira meia hora após o dano ao DNA, e a intensidade máxima de fluorescência de TbRPA1 foi observada uma hora após o tratamento com IR (Figura 4.3 A, B), principalmente em células na fase *lateS/G2* (Figura 4.3C). Além disso nós observamos uma dupla banda de TbRPA1 na análise de WB a partir dos extratos proteicos totais em uma hora após o tratamento com IR (Figura 4.5A). O ensaio de proteína fracionada (Figura 3.2) revelou que a banda superior da TbRPA1 é aquela que se liga predominantemente ao DNA em resposta aos DSBs gerados pela IR (Figura 4.7). Nós hipotetizamos que tal banda superior reflete uma modificação pós-traducional da sub-unidade 1 do complexo RPA em resposta ao dano detectado. Em eucariontes superiores há evidências mostrando que proteínas da maquinaria de reparo podem ser montadas e desmontadas dos complexos nos focos de danos através de RPA2 fosforilada por uma via de *checkpoint* ativada em resposta a danos no DNA (136). A literatura vem mostrando que a formação de complexos proteicos em resposta a danos no DNA requer também da interação de múltiplas proteínas com a RPA1 através do seu domínio N-terminal de ligação (DBD-F) (136). Porém, a cinética de recrutamento descrita neste trabalho sugere, que como mostrado para a *L. amazonenses* (99), a ausência natural do domínio N-terminal da RPA1 nos tripanosomatídeos aparentemente não afetou a participação da TbRPA1 as vias de sinalização envolvendo o reparo da DSB pela via da HR (Figura 4.10).

Para continuar analisando a cinética de recrutamento da máquina HR nas formas procíclicas do *T. brucei*, nós avaliamos o tempo que levou as principais proteínas da via TbExo1, TbRPA1 e TbRAD51 para se ligarem ao DNA após exposição a IR. Mediante o ensaio de fracionamento de proteínas nos observamos que a TbExo1 ligado ao DNA atingiu rapidamente um pico de intensidade antes do marcador de cromatina gH2A e TbRPA1 (Figura 4.8B). Nós também observamos que o recrutamento da TbRAD51 atingiu seu pico 2 h após IR, quando os sinais de gH2A começam diminuir. Assim, nós especulamos que a intensidade máxima da TbRAD51 ligado ao DNA gera o início da desfosforilação de gH2A, restaurando-se de fato a condição basal de gH2A 6 horas após a geração de DSBs por IR (Figura 4.10). Os dados acima mostram que as formas procíclicas no *T. brucei* recrutam a via de reparo HR para o DNA de forma sequencial após a exposição a IR e que o processo de reparo tem uma duração aproximada de 5.5 h, atuando principalmente nas fases *lateS/G2*.

Cross-talk na resposta a danos no DNA no *T. brucei*

Nossos dados também mostraram algumas evidências que indicam um trabalho cooperativo entre as vias de sinalização de *checkpoint* e reparo de DNA no *T. brucei* após exposição a IR.

Apesar de mostrarmos que o reparo pela via HR leva cerca de 6 h e que este acontece preferencialmente nas fases *lateS/G2*, nós observamos uma parada de crescimento dos parasitas após IR entre 6 e 18 horas (Figura 4.1, 50Gy), sugerindo que o tempo para a retomada completa do ciclo celular parece ser maior do que o tempo da cinética de reparo de DNA pela HR. Ensaio de conteúdo de DNA mostram parasitas acumulando-se na transição G1/S 6 h após IR (Figura 4.9A). Nós especulamos que parasitas na fase G1 durante o tratamento com IR ativam um mecanismo de reparo pouco dependente ou independente das proteínas da via HR, provavelmente a via MMEJ, que é bem menos eficiente em reparar as DSBs geradas pela IR, o que conseqüentemente leva a um acúmulo de quebra no DNA que desencadeia um ponto de *checkpoint* na transição G1-S, mantendo bloqueado o crescimento da população de parasitas entre as 6 e 18 horas após dano. Porém nós observamos na Figura 4.14C, parte dos parasitas em G1 passando para fase S 4 h após IR. Isto poderia significar que esses parasitas já tenham passado do 'ponto de restrição' do ciclo celular em G1 no momento da IR (19,20). Neste caso, essas células que saíam de G1 com DSB poderiam aproveitar os mecanismos moleculares que acontecem na fase S, incluído o reparo pela via HR, ou ainda poderiam prosseguir no ciclo celular com danos no DNA até a fase G2 (35,36). Em relação aos mecanismos de *checkpoint* governados pela ATR nós observamos um padrão de fosforilação de gH2A que aparentemente ocorre via ação de ATR. Em mamíferos, DSBs leva a uma resposta de fosforilação rápida de gH2AX, conseqüência principalmente da atividade de ATM, que leva minutos (130). No *T. brucei* a fosforilação de gH2A parece acompanhar a curva da cinética da RPA, que, como discutido na introdução, participa ativamente da ativação da via da ATR (34). Assim, parece que no *T. brucei* esta fosforilação é principalmente via ATR e não ATM após exposição a IR. Também nós observamos a cooperação entre a via de *checkpoint* ATR e o recrutamento de algumas das proteínas principais da via de HR. Para estudar isso nós monitoramos RAD51, o marcador de cromatina gH2A e a proteína de ligação a simples fita RPA2

na ausência de ATR após a exposição a IR. Na Figura 4.24, Figura 4.25 e Figura 4.26, nós observamos uma resposta irregular dessas proteínas da via HR na ausência da quinase. O sinal positivo da RAD51 (Figura 4.26B, padrão espalhado) foi totalmente perdido na ausência de ATR, como acontece em mamíferos (137), o que nós especulamos ser consequência da desregulação da proteína RPA. Esses eventos devem gerar um processo de reparo pela via HR aberrante ou ausente o que deve desencadear um padrão de fosforilação da gH2A diferente do observado em células *wild type* irradiadas (Figura 4.24, WT+ 50 Gy).

Tratamento com pentamidina no contexto do ciclo celular

Compreendido um pouco melhor a resposta do *T. brucei* frente a quebras no DNA, nós questionamos se a inibição das vias de *checkpoint* do ciclo celular do *T. brucei* sob o controle de ATM e ATR influenciam a ação da pentamidina. Nós primeiro investigamos se a pentamidina, que é um ligante de regiões AT no DNA, gera quebras no DNA. Nós observamos DNA fragmentado acontecendo 2 h após tratamento com pentamidina Figura 4.28, com o máximo de pico no TUNEL positivo 12 h após dano, diferente do perfil do TUNEL de células expostas a IR onde nós observamos a desaparecimento dos picos positivos 2 h após tratamento Figura 4.2A. Tais diferenças podem ser devido a natureza dos agentes que levam a mecanismos diferentes de geração de quebras de dupla fita. A IR é uma fonte agressiva de danos, levando a geração massiva de quebras no DNA genômico, o que pode ativar mais rapidamente o mecanismo de reparo, fazendo com que os fatores envolvidos migrem para as pontas fragmentada do DNA. Já a pentamidina, a sua preferência pelas regiões AT do DNA (109), pode influenciar na probabilidade de geração das quebras em sítios específicos do DNA. Neste cenário, dependendo da concentração da droga e da velocidade de armazenamento no parasita (113-115), as quebras podem acontecer de forma diferente quando comparadas a IR levando a um recrutamento distinto dos mecanismos de reparo para o DNA. De qualquer maneira, nós observamos que o tratamento com pentamidina leva a fosforilação da histona H2A (Figura 4.29B) acompanhando o perfil de DNA fragmentado do TUNEL, o que sugere que o parasita ativa também uma via de sinalização de *checkpoint* em resposta a tratamento com a pentamidina. Uma vez que a pentamidina gera quebras no DNA e possivelmente ativa uma via de sinalização para a fosforilação da H2A, nós padronizamos um ensaio de

combinação de drogas para inibir a ação das quinases ATM e ATR e monitorar a ação da pentamidina sob parasitas com o sinal de *checkpoint* inibido. A (Figura 4.30) mostrou um efeito aumentado da pentamidina sob o DNA, quando inibidas as quinases de forma simples ou combinada. Provavelmente, a inibição das quinases bloqueou a sinalização do dano, que então não pode ser reparado. A alta quantidade de DSBs gerada deve inibir o crescimento celular por tornar a célula inviável (Figura 4.31). O ensaio de viabilidade celular de fato mostrou um maior efeito da pentamidina quando esta é combinada com os inibidores de ATM e ATR. Assim, esses dados mostram que o conhecimento do ciclo celular nos tripanossomas, bem como do modo de ação de drogas, pode levar ao desenvolvimento de terapias combinatórias que devem auxiliar no controle das doenças causadas por estes parasitas.

6 CONCLUSÃO

Nós mostramos que, após tratamento com IR, o *T. brucei* ativa pontos de *checkpoint* para interromper o ciclo celular coordenados pelas quinases tripanosomais PI3KKs. A resposta via ATM e ATR segue um padrão diferenciado e dependente das fases do ciclo celular do parasita no momento do dano. Após DSBs, ATM tem um papel principal controlando a transição G1-S e intra-S do ciclo celular, enquanto a ATR exibe funções importantes no *checkpoint intra-S*, bem como na passagem dos parasitas nas fases G2/M.

Porém as vias de sinalização de *checkpoint* não são independentes dos mecanismos de reparo de DNA no *T. brucei*. Durante as fases *lateS/G2*, após danos no DNA o marcador de cromatina gH2A é fosforilado e a maquinaria HR é sequencialmente recrutada para o DNA desencadeando o reparo das DSBs via RAD51 em aproximadamente 6 h. Este processo está sob a regulação da quinase ATR. Esse mecanismo foi ausente nas fases *G1/earlyS* onde sugerimos um mecanismo independente das proteínas da via HR atuando no conserto das DSBs e que leva mais de 6 h para consertar os danos ao DNA.

Finalmente, nós mostramos que a pentamidina gera quebras de DNA e ativa uma via que fosforila o marcador de histona de DSBs, gH2A. A ausência das quinases ATM e/ou ATR sensibilizou o parasita frente a pentamidina, aumentando as quebras de DNA geradas pela droga.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). [cited 2018 Dec 20]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
2. Ponte-Sucre A. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host–Parasite Interaction. *Front Microbiol.* 2016;7(2126): 1-7.[10.3389/fmicb.2016.02126]
3. Franco JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol.* 2014;6: 257:275. [10.2147/CLEP.S39728]
4. Simarro PP, Cecchi G, Paone M, Franco JR, Diarra A, Ruiz JA, et al. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Intl Journal of Health Geo.* 2010;9(57):1-18. [<https://doi.org/10.1186/1476-072X-9-57>]
5. Stich A, Abel PM, Krishna S. Clinical review Human African trypanosomiasis. *BMJ.* 2010; 325 (7357) : 203–206. [PMCID1123723/pdf/203.pdf]
6. Kennedy PG. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol.* 2013;12(2):186–94. [10.1016/S1474-4422(12)70296-X]
7. La Greca F, Magez S. Vaccination against trypanosomiasis Can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist? *Spec Focus Rev Neglected Vaccines.* 2011;7(11):1225–33. [10.4161/hv.7.11.18203]
8. Rodgers J. Human African trypanosomiasis, chemotherapy and CNS disease. *J Neuroimmunol.* 2009;211(1-2):16-22. [10.1016/j.jneuroim.2009.02.007]
9. Barrett MP, Boykin DW, Brun R, Tidwell RR. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol.* 2007;152:1155–71.[10.1038/sj.bjp.0707354]
10. Baker N, De Koning HP, Mä Ser P, Horn D. Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends Parasitol.* 2013;29:110–8. [10.1016/j.pt.2012.12.005]
11. Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, et al. Nifurtimox-efl ornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet.* 2009;374:56–64. [10.1016/S0140-6736(09)61117-X.]
12. Simarro P, franco J, Diarra A, Postigo J, Jannin J. Update on field use of the available drugs for the chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitology.* 2012;139(07):842–6. [10.1017/S0031182012000169]
13. Iten M, Mett H, Evans A, Enyaru JC, Brun R, Kaminsky R. Alterations in ornithine

decarboxylase characteristics account for tolerance of *Trypanosoma brucei* rhodesiense to D,L-alpha-difluoromethylornithine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(9):1922–1925.

14. Epting CL, Emmer BT, Du NY, Taylor JM, Mekanji MY, Olson CL, et al. Cell Cycle Inhibition To Treat Sleeping Sickness. *MBio.* 2017;8(5):1427–17. [10.1128/mBio.01427-17]

15. Amaro RE, Schnauffer A, Interthal H, Hol W, Stuart KD, Mccammon JA. Discovery of drug-like inhibitors of an essential RNA-editing ligase in *Trypanosoma brucei*. 2008; 105 (45): 17278-17283. [10.1073/pnas.0805820105]

16. Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2001;7(8):2168–81.

17. Vermeulen K, Bockstaele DR Van, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36:131–49.

18. Harper J V, Brooks G. The mammalian cell cycle: an overview. *Methods Mol Biol.* 2005;296:113–53.

19. Cook SJ, Balmanno K, Garner A, Millar T, Taverner C, Todd D. Regulation of cell cycle re-entry by growth, survival and stress signalling pathways. *Biochem Soc.* 2000;28(2):233-240. [10.1042/bst0280233]

20. Bagga S, Bouchard MJ. Cell Cycle Regulation During Viral Infection. In: Springer, editor. *Methods in Molecular Biology.* New York: Springer Science & Business media; 2014: 165–227.[10.1007/978-1-4939-0888-2_10]

21. Graña X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 1995;11(2):211–9.

22. Diaz-Padilla I, Siu LL, Duran I. Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. *Invest New Drugs.* 2009;27:586–94. [10.1007/s10637-009-9236-6.]

23. Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 2013;23(7):345–56.

24. Assoian RK, Zhu X. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(1):93–8.

25. Sherr CJ. G1 Phase Progression: Cycling on Cue. *Cell.* 1994; 79(4):551-555.

26. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzari T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Lett to Nat.* 1998;391:597–601.

27. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci.* 2004 Aug;29(8):409-17.[10.1016/j.tibs.2004.06.006].
28. Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Interplay Between the Cell Cycle and Double-Strand Break Response in Mammalian Cells. In: Noguchi E, Gadaleta MC, editors. *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols.* New York: Springer Science & Business Media. 2014; 2014;1170:41-59.[10.1007/978-1-4939-0888-2_3.]
29. Stark GR, Taylor WR. Control of the G₂/M Transition. *Mol Biotechnol.* 2006;32:227–248.[10.1385/MB:32:3:227]
30. Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Cell Regul.* 1999;11:267–73.
31. Smits VAJ, Medema RH. Checking out the G₂/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1519:1–12.
32. Neal JA, Meek K. Choosing the right path: Does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res.* 2011;711:73–86.[10.1016/j.mrfmmm.2011.02.010.]
33. Langerak P, Russell P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 ; 366 (1584) : 3562-3567. [10.1098/rstb.2011.0070.]
34. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell Rev.* 2017;66:801–17. [10.1016/j.molcel.2017.05.015]
35. Deckbar D, Stiff T, Koch B, Reis C, Löbrich M, Jeggo PA. The Limitations of the G₁-S Checkpoint. *Cancer Res.* 2010;70(11):4412–4421.[10.1158/0008-5472.CAN-09-3198.]
36. Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2011;46(4):271–283.[10.3109/10409238.2011.575764.]
37. Gannon HS, Woda BA, Jones SN. Cancer Cell Article ATM Phosphorylation of Mdm2 Ser394 Regulates the Amplitude and Duration of the DNA Damage Response in Mice. *Cancer Cell.* 2012;21:668–79.[10.1016/j.ccr.2012.04.011]
38. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G₁ by stabilizing p53. *GENES Dev.* 2000;14:278–88.
39. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. An overview of the Cell Cycle. In: *Molecular biology of the cell.* 4th ed. Garland Science; 2002.
40. Yamauchi M, Oka Y, Yamamoto M, Niimura K, Uchida M, Kodama S, et al. Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G₁ checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(3):405–17. [10.1016/j.dnarep.2007.11.011.]

42. Cescutti R, Negrini S, Kohzaki M, Halazonetis TD. TopBP1 functions with 53BP1 in the G1 DNA damage checkpoint. *EMBO J.* 2010;29:3723–32. [10.1038/emboj.2010.238.]
43. Mordes DA, Glick GG, Zhao R, Cortez D. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev.* 2008 Jun 1;22(11):1478-89. doi: 10.1101/gad.1666208.
44. Girard P-M, Riballo E, Begg AC, Waugh A, Jeggo PA. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene.* 2002;21:4191–9.[10.1038/sj.onc.1205596]
45. Grallert B, Boye & E. The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle.* 2008;7:2315–20.[10.4161/cc.6389]
46. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature.* 2005;434(7033):605–611. [10.1038/nature03442]
47. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Sci .* 2003;300(5625):1542–8.[10.1126/science.1083430]
48. Gell D, Jackson SP. Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res.* 1999 Sep 1;27(17):3494-502.
49. Myers JS, Cortez D. Rapid Activation of ATR by Ionizing Radiation Requires ATM and Mre11. *Natl Inst Heal.* 2006;281(14):9346–9350.[10.1074/jbc.M513265200]
50. Cuadrado M, Martinez-Pastor B, Murga M, Toledo LI, Gutierrez-Martinez P, Lopez E, et al. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J Exp Med.* 2006;203(2):297–303.[10.1084/jem.20051923]
51. Adams KE, Medhurst AL, Dart DA, Lakin ND. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene.* 2006;25(28):3894–3904.[10.1038/sj.onc.1209426]
52. Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GCM, Lukas J, et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2006;8(1):37–45. [10.1038/ncb1337]
53. Namiki Y, Zou L. ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(3):580-585.[10.1073/pnas.0510223103]
54. Zhao H, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1 cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G 2 checkpoints. *PNAS.* 2002;99(23):14795–14800. [10.1073pnas.182557299]

55. Smith KD, Fu MA, Brown EJ. Tim-Tipin dysfunction creates an indispensable reliance on the ATR-Chk1 pathway for continued DNA synthesis. *J Cell Biol.* 2009;187(1):15–23. [10.1083/jcb.200905006.]
56. Luke-Glaser S, Luke B, Grossi S, Constantinou A. FANCM regulates DNA chain elongation and is stabilized by S-phase checkpoint signalling. *EMBO J.* 2010 17;29(4):795-805. [10.1038/emboj.2009.371]
57. Mailand N, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J. Destruction of claspin by SCF bTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell.* 2006;23:307–18. [10.1016/j.molcel.2006.06.016]
58. Peschiaroli A, Valerio Dorrello N, Guardavaccaro D, Venere M, Halazonetis T, Sherman NE, et al. SCF bTrCP-Mediated Degradation of Claspin Regulates Recovery from the DNA Replication Checkpoint Response. *Mol Cell.* 2006;23:319-329. [10.1016/j.molcel.2006.06.013]
59. Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth A-S, Loseva O, Issaeva N, et al. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J.* 2009;28:2601–2615. [10.1038/emboj.2009.206.]
60. Hashimoto Y, Ray Chaudhuri A, Lopes M, Costanzo V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(11):1305–11. [10.1038/nsmb.1927]
61. Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell.* 2011;145(4):529-42. [10.1016/j.cell.2011.03.041]
62. Löbrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(11):861–869. [10.1038/nrc2248]
63. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 2001;15:2177–2196. [10.1101/gad.914401]
64. Zhou Y, Lee J-H, Jiang W, Crowe JL, Zha S, Correspondence TTP, et al. Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM. *Mol Cell.* 2017;65:91–104. [10.1016/j.molcel.2016.11.004]
65. Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, et al. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 2006;25:5775–82. [10.1038/sj.emboj.7601446]
66. Scully R, Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res.* 2013;750(1–2):5–14. [10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007.]
67. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell.* 2005;123(7):1213–26. [10.1016/j.cell.2005.09.038]

68. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol Cell*. 2012;47:497–510. [10.1016/j.molcel.2012.07.029]
69. Spycher C, Miller ES, Townsend K, Pavic L, Morrice NA, Janscak P, et al. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol*. 2008;181(2):227–240. [10.1083/jcb.200709008]
70. Huen MSY, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, et al. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 2007;131(5):901–914. [10.1016/j.cell.2007.09.041]
71. Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, et al. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 2007;131(5):887–900. [10.1016/j.cell.2007.09.040]
72. Iliakis G, Murmann T, Soni A. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;793:166-175. [10.1016/j.mrgentox.2015.07.001.
73. Lazzaro F, Giannattasio M, Puddu F, Granata M, Pelliccioli A, Plevani P, et al. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)*. 2009;8:1055–1067. [10.1016/j.dnarep.2009.04.022]
74. Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 2008;18:99–113. [10.1038/cr.2008.1]
75. Molyneux DH, Savioli L, Engels D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet*. 2017 Jan 21;389(10066):312-325. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30171-4.
76. Pavani RS, da Silva MS, Fernandes CAH, Morini FS, Araujo CB, Fontes MR de M, et al. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Dec 16;10(12):e0005181. doi: 10.1371/journal.pntd.0005181.
77. Cross GAM. African trypanosomes in the 21st century: what is their future in science and in health? *Int J Parasitol*. 2001;31:427–33.
78. Tiengwe C, Marques CA, McCulloch R. Nuclear DNA replication initiation in kinetoplastid parasites: new insights into an ancient process. *Cell Press*. 2014;30(1):1–10. [10.1016/j.pt.2013.10.009.]
79. Hayashi H, Akiyoshi B. Degradation of cyclin B is critical for nuclear division in *Trypanosoma brucei*. *Biol Open*. 2018;7:1-7. [10.1242/bio.031609]

80. Epting CL, Emmer BT, Du NY, Taylor JM, Mekanji MY, Olson CL, et al. Cell Cycle Inhibition To Treat Sleeping Sickness. *MBio*. 2017 19;8(5):1-17. [doi: 10.1128/mBio.01427-17]
81. Valente M, Timm J, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Pérez LM, Balzarini T, Nettleship JE, et al. Cell cycle regulation and novel structural features of thymidine kinase, an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*. 2016;102(3):365–85.[10.1111/mmi.13467]
82. Wenzler T, Burkard GS, Schmidt RS, Mäser P, Bergner A, Roditi I, et al. A new approach to chemotherapy: drug-induced differentiation kills African trypanosomes. *Sci Rep*. 2016;6(22451):1–10.[10.1038/srep22451.]
83. Krüger T, Schuster S, Engstler M. Beyond Blood: African Trypanosomes on the Move. *Trends Parasitol*. 2018;34(12):1056–1067. [10.1016/j.pt.2018.08.002.]
84. Vickerman K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull*. 1985;41(2):105–114.
85. Hammarton TC. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;153:1–8.[10.1016/j.molbiopara.2007.01.017]
86. Akiyoshi B, Gull K. Discovery of Unconventional Kinetochores in Kinetoplastids. *Cell*. 2014;156:1247–1258.[10.1016/j.cell.2014.01.049]
87. da Silva MS, Muñoz PAM, Armelin HA, Elias MC. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*. 2017;64(6):756–70. [10.1111/jeu.12408]
88. Gourguechon S, Savich JM, Wang CC. The Multiple Roles of cyclin E1 in Controlling Cell Cycle Progression and Cellular Morphology of *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol*. 2007;368(4):939–50.[10.1016/j.jmb.2007.02.050]
89. Hammarton TC, Engstler M, Mottram JC. The *Trypanosoma brucei* Cyclin, CYC2, Is Required for Cell Cycle Progression through G1 Phase and for Maintenance of Procyclic Form Cell Morphology. *J Biol Chem*. 2004;279(23):24757–2464.[10.1074/jbc.M401276200]
90. Tu X, Wang CC. Pairwise knockdowns of cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* identified the CRKs for G1/S and G2/M transitions and demonstrated distinctive cytokinetic regulations between two developmental stages of the organism. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):755–64. [10.1128/EC.4.4.755-764.2005]
91. Hammarton TC. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;153:1–8.[10.1016/j.molbiopara.2007.01.017]
92. Gourguechon S, Wang CC. CRK9 contributes to regulation of mitosis and cytokinesis in the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *BMC Cell Biol*. 2009;10:68. [10.1186/1471-2121-10-68]

93. Dobson R, Stockdale C, Lapsley C, Wilkes J, McCulloch R. Interactions among *Trypanosoma brucei* RAD51 paralogues in DNA repair and antigenic variation. *Mol Microbiol.* 2011;81(2):434–456. [10.1111/j.1365-2958.2011.07703.x]
94. Hartley CL, McCulloch R. *Trypanosoma brucei* BRCA2 acts in antigenic variation and has undergone a recent expansion in BRC repeat number that is important during homologous recombination. *Mol Microbiol.* 2008;68(5):1237–1251. [10.1111/j.1365-2958.2008.06230.x.]
95. Marin PA, da Silva MS, Pavani RS, Machado CR, Elias MC. Recruitment kinetics of the homologous recombination pathway in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* after ionizing radiation treatment. *Sci Rep.* 2018;8(1):5405-5411. [10.1038/s41598-018-23731-6.]
96. Vieira-da-Rocha JP, Passos-Silva DG, Mendes IC, Rocha EA, Gomes DA, Machado CR, et al. The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome. *DNA Repair (Amst).* 2019;73:78-90. [10.1016/j.dnarep.2018.11.005]
97. Urbaniak MD, Martin DMA, Ferguson MAJ. Global Quantitative SILAC Phosphoproteomics Reveals Differential Phosphorylation Is Widespread between the Procyclic and Bloodstream Form Lifecycle Stages of *Trypanosoma brucei*. *J Proteome Res.* 2013;12(5):2233-2244. [10.1021/pr400086y]
98. Glover L, Horn D. Trypanosomal histone γ H2A and the DNA damage response. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;183:78–83. [10.1016/j.molbiopara.2012.01.008]
99. da Silveira R, da Silva M, Nunes VS, Perez AM, Cano MI. The natural absence of RPA1N domain did not impair *Leishmania amazonensis* RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection. *Parasitology.* 2013;140(4):547–59. [10.1017/S0031182012002028.]
100. Da Silva MS, Pavani RS, Damasceno JD, Marques CA, McCulloch R, Orsini Tosi LR, et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. *Trends Parasitol.* 2017;33(11):858-874. [10.1016/j.pt.2017.08.002]
101. Stortz JA, Serafim TD, Alford S, Wilkes J, Fernandez-Cortes F, Hamilton G, et al. Genome-wide and protein kinase-focused RNAi screens reveal conserved and novel damage response pathways in *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathog.* 2017;13(7):e1006477. [10.1371/journal.ppat.1006477]
102. Magdaleno A, Ahn I-Y, Paes LS, Silber AM. Actions of a Proline Analogue, L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 2009;4(2):e4534. [10.1371/journal.pone.0004534]
103. Damasceno FS, Barisón MJ, Pral EMF, Paes LS, Silber AM. Memantine, an Antagonist of the NMDA Glutamate Receptor, Affects Cell Proliferation, Differentiation

and the Intracellular Cycle and Induces Apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2717. [10.1371/journal.pntd.0002717.]

104. Duque MD, Camps P, Torres E, Valverde E, Sureda FX, López-Querol M, et al. New oxapolycyclic cage amines with NMDA receptor antagonist and trypanocidal activities. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(1):46–57. [10.1016/j.bmc.2009.11.017.]

105. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247–254. [10.1038/85798]

106. Sakaguchi K, Ishibashi T, Uchiyama Y, Iwabata K. The multi-replication protein A (RPA) system - A new perspective. *FEBS J*. 2009;276(4):943–63. [10.1111/j.1742-4658.2008.06841]

107. Bernardes da Silva R, Renato Machado C, Rogelis Aquiles Rodrigues A, Luiz Pedrosa D A, Carolina Elias M, Butantan I. Selective human inhibitors of ATR and ATM render *Leishmania* major promastigotes sensitive to oxidative damage. *PLoS One*. 2018 Sep 28;13(9):e0205033. doi: 10.1371/journal.pone.0205033

108. Calderano SG, Drosopoulos WC, Quaresma MM, Marques CA, Kosiyatrakul S, McCulloch R, et al. Single molecule analysis of *Trypanosoma brucei* DNA replication dynamics. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(5):2655–2665. [10.1093/nar/gku1389.]

109. Edwards KJ, Jenkins TC, Neidle S. Crystal Structure of a Pentamidine-Oligonucleotide Complex: Implications for DNA-Binding Properties. *Biochemistry* 1992;31(31):7104-7109. [10.1021/bi00146a011]

110. Mathis AM, Bridges AS, Ismail MA, Kumar A, Francesconi I, Anbazhagan M, et al. Diphenyl Furans and Aza Analogs: Effects of Structural Modification on In Vitro Activity, DNA Binding, and Accumulation and Distribution in Trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(8):2801–2810. [10.1128/AAC.00005-07]

111. Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR, et al. Accumulation and Intracellular Distribution of Antitrypanosomal Diamidine Compounds DB75 and DB820 in African Trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(6):2185–2191. [10.1128/AAC.00192-06]

112. Scott FJ, Khalaf AI, Giordani F, Wong PE, Duffy S, Barrett M, et al. An evaluation of Minor Groove Binders as anti-*Trypanosoma brucei* therapeutics. 2016;116:116-125. [10.1016/j.ejmech.2016.03.064]

113. Shapiro TA, Englund PT. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87(3):950-954.

114. Lanteri CA, Tidwell RR, Meshnick SR. The Mitochondrion Is a Site of Trypanocidal Action of the Aromatic Diamidine DB75 in Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei* Downloaded from. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):875–82. [10.1128/AAC.00642-07]

115. Damper D, Patton CL. Pentamidine transport and sensitivity in brucei-group

trypanosomes. *J Protozool.* 1976;23(2):349-356.

116. Delespaux V, De Koning HP. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat.* 2007;10(1-2):30-50. [10.1016/j.drug.2007.02.004]

117. Wang M, Yu Y, Liang C, Lu A, Zhang G. Recent Advances in Developing Small Molecules Targeting *Int J Mol Sci.* 2016 May 30;17(6). pii: E779. doi: 10.3390/ijms17060779.

118. Sancar A, Lindsey-Boltz L, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39–85. [10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723]

119. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993;362(6422):709–715.

120. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009;461(7267):1071–1078. [10.1038/nature08467.]

121. Pino P, Taoufiq Z, Brun M, Tefit M, Franetich JF, Ciceron I, et al. Effects of hydroxyurea on malaria, parasite growth and adhesion in experimental models. *Parasite Immunol.* 2006;28(12):675–80. [10.1111/j.1365-3024.2006.00907.x]

122. Martinez-Rojano H, Mancilla-Ramirez J, Quiñonez-Diaz L, Galindo-Sevilla N. Activity of Hydroxyurea against *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3642–3647. [10.1128/AAC.00124-08]

123. Tan KSW, Leal STG, Cross GAM. *Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;125:11–21.

124. Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, Furtado C. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids.* 2010;2010:1–14. [10.4061/2010/840768.]

125. Garcia JBF, Vieira Da Rocha JP, Costa-Silva HM, Alves CL, Machado CR, Cruz AK. *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* present distinct DNA damage responses. *Mol Biochem Parasitol.* 2016;207:23–32. [10.1016/j.molbiopara.2016.05.004.]

126. Andrade HM, Murta SMF, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benzimidazole. *J Proteome Res.* 2008;7(6):2357–2367. [10.1021/pr700659m]

127. Sokolov M V., Neumann RD. Human Embryonic Stem Cell Responses to Ionizing Radiation Exposures: Current State of Knowledge and Future Challenges. *Stem Cells Int.* 2012;2012:1–11. [10.1155/2012/579104.]

128. Burton P, McBride DJ, Wilkes JM, Barry JD, McCulloch R. Ku Heterodimer-Independent End Joining in *Trypanosoma brucei* Cell Extracts Relies upon Sequence Microhomology. *Eukaryot Cell*. 2007;6(10):1773–81.[10.1128/EC.00212-07]
129. Kozlov S V., Graham ME, Jakob B, Tobias F, Kijas AW, Tanuji M, et al. Autophosphorylation and ATM Activation. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9107–9119.[10.1074/jbc.M110.204065.]
130. Houtgraaf J, Versmissena J, van der Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006 Jul-Sep;7(3):165-72.[10.1016/j.carrev.2006.02.002]
131. Downs JA, Lowndes2 NF, Jackson SP. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*. 2000;408(6815):1001-1004.[10.1038/35050000]
132. Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11;99(12):8173-8178.[10.1073/pnas.122228699]
133. Genois M-M, Paquet ER, Laffitte M-CN, Maity R, Rodrigue A, Ouellette M, et al. DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(1):40–73. [10.1128/MMBR.00045-13]
134. Damasceno JD, Obonaga R, Santos E V, Scott A, McCulloch R, Tosi LRO. Functional compartmentalization of Rad9 and Hus1 reveals diverse assembly of the 9-1-1 complex components during the DNA damage response in *Leishmania*. *Mol Microbiol*. 2016 Sep; 101(6): 1054–1068.[10.1111/mmi.13441]
135. Macphail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL. Cell Cycle-Dependent Expression of Phosphorylated Histone H2AX: Reduced Expression in Unirradiated but not X-Irradiated G 1 -Phase Cells. *Source Radiat Res* 2008;159(6):759–67.
136. Oakley GG, Patrick SM. Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front Biosci*. 2010;15:883–900.
137. Ré mi Buisson A, Niraj J, lie Rodrigue A, Xia B, Masson J-Y, Zou Correspondence L. Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Mol Cell*. 2017;65:336–346. [10.1016/j.molcel.2016.12.007.]

APÊNDICES - ARTIGOS DE PERIÓDICOS

APÊNDICE A- Artigo publicado na *Scientific Reports*

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Recruitment kinetics of the homologous recombination pathway in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* after ionizing radiation treatment

Received: 22 September 2017
Accepted: 13 February 2018
Published online: 29 March 2018

Paula Andrea Marin¹, Marcelo Santos da Silva ¹, Raphael Souza Pavani¹, Carlos Renato Machado² & Maria Carolina Elias¹

One of the most important mechanisms for repairing double-strand breaks (DSBs) in model eukaryotes is homologous recombination (HR). Although the genes involved in HR have been found in *Trypanosoma brucei* and studies have identified some of the proteins that participate in this HR pathway, the recruitment kinetics of the HR machinery onto DNA during DSB repair have not been clearly elucidated in this organism. Using immunofluorescence, protein DNA-bound assays, and DNA content analysis, we established the recruitment kinetics of the HR pathway in response to the DSBs generated by ionizing radiation (IR) in procyclic forms of *T. brucei*. These kinetics involved the phosphorylation of histone H2A and the sequential recruitment of the essential HR players Exo1, RPA, and Rad51. The process of DSB repair took approximately 5.5 hours. We found that DSBs led to a decline in the G2/M phase after IR treatment, concomitant with cell cycle arrest in the G1/S phase. This finding suggests that HR repairs DSBs faster than the other possible DSB repair processes that act during the G1/S transition. Taken together, these data suggest that the interplay between DNA damage detection and HR machinery recruitment is finely coordinated, allowing these parasites to repair DNA rapidly after DSBs during the late S/G2 proficient phases.

Trypanosoma brucei is a single-celled digenetic extracellular parasite and the etiological agent of human African trypanosomiasis (sleeping sickness), which almost invariably progresses to death unless treated. This disease is present in many countries in sub-Saharan Africa, which is the poorest region worldwide, causing approximately 70,000 deaths per year^{1,2}. This organism replicates in the blood and tissue fluids of mammals (as bloodstream forms) and in the digestive system of tsetse flies (often as procyclic forms). During their migration towards the salivary glands, the procyclic forms differentiate into mesocyclic or epimastigote forms, and in the salivary glands, epimastigotes transform into non-replicative metacyclic forms that can infect mammals³. During their transition in different environments and due to their frequent replication, DNA lesions often form that can lead to genomic instability. Among the different types of lesions that occur in DNA, double-strand DNA breaks (DSBs) are the most important because they can have hazardous effects on the cell and are a source of recombination, which is essential during the life cycle of this parasite^{4,5}. Although studies have shown that DSBs trigger a robust DNA damage response in *T. brucei*^{4,6}, the duration of this process as well as the recruitment kinetics of the primary proteins involved in this process are not well established.

Model eukaryotes have two major repair pathways to ameliorate DSBs and ensure genomic integrity: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). The HR machinery is restricted to the late-S and G2 phases, while the NHEJ machinery is available during all phases of the cell cycle and is predominant

¹Cell Cycle Laboratory (LECC) - Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, 05503-900, Brazil. ²Biochemical and Immunology Department, Institute of Biomedical Science, ICB, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.C.E. (email: carolina.eliasabbaga@butantan.gov.br)

APÊNDICE B- Artigo publicado no *Journal of Eukaryotic Microbiology*

ORIGINAL ARTICLE

Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids

Marcelo Santos da Silva, Paula Andrea Marin Muñoz, Hugo Aguirre Armelin & Maria Carolina Elias 

Laboratório Especial de Ciclo Celular, Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, 1500, Vital Brasil Avenue, 05503-900, São Paulo, Brazil

Keywords

Cytokinesis; *Leishmania amazonensis*; mitosis; *Trypanosoma brucei*; *Trypanosoma cruzi*.

Correspondence

M.C. Elias, 1500, Vital Brasil Avenue, Butantã, São Paulo 05503-900, SP, Brazil
Telephone/FAX number: +55(11) 2627 9300;
e-mail: carolina.elias@butantan.gov.br

Received: 30 January 2017; revised 17 February 2017; accepted February 23, 2017.
Early View publication March 28, 2017

doi:10.1111/jeu.12408

ABSTRACT

Trypanosomatids are the etiologic agents of various infectious diseases in humans. They diverged early during eukaryotic evolution and have attracted attention as peculiar models for evolutionary and comparative studies. Here, we show a meticulous study comparing the incorporation and detection of the thymidine analogs BrdU and EdU in *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi* to monitor their DNA replication. We used BrdU- and EdU-incorporated parasites with the respective standard detection approaches: indirect immunofluorescence to detect BrdU after standard denaturation (2 M HCl) and “click” chemistry to detect EdU. We found a discrepancy between these two thymidine analogs due to the poor detection of BrdU, which is reflected on the estimative of the duration of the cell cycle phases G1, S, and G2. To solve this discrepancy, we increase the exposure of incorporated BrdU using different concentrations of HCl. Using a new value for HCl concentration, we re-estimated the phases G1, S, G2 + M, and cytokinesis durations, confirming the values found by this approach using EdU. In conclusion, we suggest that the studies using BrdU with standard detection approach, not only in trypanosomatids but also in others cell types, should be reviewed to ensure an accurate estimation of DNA replication monitoring.

TRYPANOSOMATIDS are a group of protozoan parasites that diverged very early during eukaryotic evolution (Baldauf 2003), and they have drawn attention as peculiar models for genetic, evolutionary, and comparative studies. This group includes human pathogens of great medical relevance, such as *Trypanosoma cruzi* (etiologic agent of Chagas disease), *Trypanosoma brucei* (etiologic agent of African Sleeping Sickness), and *Leishmania* spp. (etiologic agent of distinct forms of leishmaniasis). Altogether, these parasites infect approximately 20 million people worldwide (with over two million new cases per year), leading to approximately 50,000 deaths annually (Khare et al. 2016; McCall and McKerrow 2014).

In trypanosomatid parasites, the cell cycle is a crucial process that is essential for efficient proliferation by ensuring a correct duplication and segregation of single-copy specialized organelles such as the nucleus and kinetoplast. In general, the cell cycle includes the following two

distinct biological events: DNA replication (S phase) and mitosis (M phase), which are separated by two gap phases (G1 and G2) (Li 2012). However, most authors consider an additional phase after mitosis called cytokinesis, which ends the cell cycle creating two daughter cells, each one containing a complete set of cytoplasmic chromosomes and organelles (Glutzer 2001; Mishima et al. 2004; da Silva et al. 2013). The duration of each cell cycle phase varies considerably in different protozoans and appears to be species-specific, although it also depends on many other factors, such as parasite strain, life cycle stage, and molecular mediators (Domingo-Sananes et al. 2015; Elias et al. 2007; Hammarton 2007; Ploubidou et al. 1999; da Silva et al. 2013; Woodward and Gull 1990; Zuma et al. 2014).

As with other organisms, the calculation of the cell cycle phases in trypanosomatid parasites depends on cell proliferation assays. There are several methods to assess

SCIENTIFIC REPORTS

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

Received: 9 March 2018

Accepted: 16 August 2018

Published online: 06 September 2018

Ceres Luciana Alves¹, Bruno Marçal Repolês¹, Marcelo Santos da Silva^{1,2},
Isabela Cecília Mendes¹, Paula Andrea Marin², Pedro Henrique Nascimento Aguiar¹,
Selma da Silva Santos¹, Glória Regina Franco¹, Andréa Mara Macedo¹,
Sérgio Danilo Junho Pena², Luciana de Oliveira Andrade³, Alessandra Aparecida Guarneri⁴,
Erich Birelli Tahara¹, Maria Carolina Elias² & Carlos Renato Machado¹

Detection of genetic exchange has been a limiting factor to deepen the knowledge on the mechanisms by which *Trypanosoma cruzi* is able to generate progeny and genetic diversity. Here we show that incorporation of halogenated thymidine analogues, followed by immunostaining, is a reliable method not only to detect *T. cruzi* fused-cell hybrids, but also to quantify their percentage in populations of this parasite. Through this approach, we were able to detect and quantify fused-cell hybrids of *T. cruzi* clones CL Brener and Y. Given the increased detection of fused-cell hybrids in naturally-occurring hybrid CL Brener strain, which displays increased levels of RAD51 and BRCA2 transcripts, we further investigated the role of Rad51 – a recombinase involved in homologous recombination – in the process of genetic exchange. We also verified that the detection of fused-cell hybrids in *T. cruzi* overexpressing RAD51 is increased when compared to wild-type cells, suggesting a key role for Rad51 either in the formation or in the stabilization of fused-cell hybrids in this organism.

The parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which is present in more than twenty countries in the Americas, currently affecting eight to ten million people¹. Similarly to other members of the Trypanosomatidae family, *T. cruzi* is a pathogen that exhibits a complex life cycle, involving both vertebrate and invertebrate hosts^{2,3}.

Since the discovery of Chagas disease, there have been heated debates on *T. cruzi* reproductive mode as it is not well established yet if its progeny is generated by preponderate clonal evolution, or if cryptic events of genetic exchange promoted by sexual reproduction – which would lead to the occurrence of natural hybrids – could possibly play a role in this process. In fact, despite of various studies on the topic, many fundamental aspects about the mechanisms by which *T. cruzi* cells reproduce remain unknown to date^{4,5}.

It is well accepted that the wide array of clinical manifestations of Chagas disease is related to hosts genetics and environment factors, as well as to the great genetic variability observed among *T. cruzi* genetic groups⁶. Currently, these genetic groups are divided into six discrete typing units (DTUs), or clades, namely TcI to TcVI. The *T. cruzi* classification in DTUs is based on molecular markers, geographic distribution, epidemiological associations, and clinical manifestations^{7–10}. Interestingly, with the attempt to clarify the evolutionary relations between all these groups, evidence was found suggesting the natural occurrence of genetic exchange in some of them. TcV and TcVI were identified as hybrids originated from TcII and TcIII^{4,11–14}. Moreover, back in 2003, Gaunt *et al.* were able to identify events of genetic exchange by detecting the presence of *T. cruzi* fused-cell hybrids isolated from the mammalian host carrying two different drug-resistance markers (neomycin and hygromycin B), each one coming from distinct populations of *T. cruzi* I¹², suggesting that genetic exchange could take place in specific life cycle phases¹². However, it is not clear yet if the mechanisms of such genetic exchange in

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²Laboratório Especial de Ciclo Celular, Centro de Toxinas, Resposta Imune e Sinalização Celular, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ³Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. ⁴Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil. Ceres Luciana Alves, Bruno Marçal Repolês and Marcelo Santos da Silva contributed equally. Correspondence and requests for materials should be

addressed to C.R.M. (email: crmachad@icb.ufmg.br)

APÊNDICE C- Artigo publicado em *Bio-Protocol*www.bio-protocol.org/e3125Vol 8, Iss 24, Dec 20, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.3125**Analysis of DNA Exchange Using Thymidine Analogs (AExTA) in *Trypanosoma cruzi***Marcelo S. da Silva^{1,§,*}, Paula A. Marin¹, Bruno M. Repolês²,
Maria C. Elias^{1,*} and Carlos R. Machado^{2,*}

¹Laboratório Especial de Ciclo Celular (LECC), Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, Brazil; ²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; [§]Present address: The Wellcome Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

*For correspondence: marcelo.dsilva@butantan.gov.br; carolina.eliassabbaga@butantan.gov.br; crmachad@icb.ufmg.br

[Abstract] *Trypanosoma cruzi* is a protozoan parasite belonging to the Trypanosomatidae family. Although the trypanosomatids multiply predominantly by clonal generation, the presence of DNA exchange in some of them has been puzzling researchers over the years, mainly because it may represent a novel form that these organisms use to gain variability. Analysis of DNA Exchange using Thymidine Analogs (AExTA) is a method that allows the *in vitro* detection and measurement of rates of DNA exchange, particularly in trypanosomatid cells, in a rapid and simple manner by indirect immunofluorescence assay (IFA). The method can be used to detect DNA exchange within one trypanosomatid lineage or among different lineages by paired analysis. The principle of this assay is based on the incorporation of two distinguishable halogenated thymidine analogs called 5'-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) and 5'-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) during DNA replication. After mixing the two cell cultures that had been previously incorporated with CldU and IdU separately, the presence of these unusual deoxynucleosides in the genome can be detected by specific antibodies. For this, a DNA denaturation step is required to expose the sites of thymidine analogs incorporated. Subsequently, a secondary reaction using fluorochrome-labeled antibodies will generate distinct signals under fluorescence analysis. By using this method, DNA exchange verification (*i.e.*, the presence of both CldU and IdU in the same cell) is possible using a standard fluorescence microscope. It typically takes 2-3 days from the thymidine analogs incorporation to results. Of note, AExTA is relatively cheap and does not require transfections or harsh genetic manipulation. These features represent an advantage when compared to other time-consuming protocols that demand DNA manipulation to introduce distinct drug-resistance markers in different cells for posterior selection.

Keywords: DNA exchange, Genetic exchange, Thymidine analogs, CldU, IdU, DNA replication, Trypanosomatids, *Trypanosoma cruzi*

[Background] Trypanosomatids parasites are single-celled eukaryotes within the supergroup Excavata (Adl *et al.*, 2012). Among them, there are human pathogens responsible for causing several devastating diseases such as *T. cruzi* (etiological agent of Chagas disease, also called American trypanosomiasis),