

**RAPHAEL SOUZA PAVANI**

**Análise funcional do complexo *Replication Protein A*  
em tripanossomatídeos e seu envolvimento com  
DNA telomérico**

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

**RAPHAEL SOUZA PAVANI**

**Análise funcional do complexo *Replication Protein A*  
em tripanossomatídeos e seu envolvimento com  
DNA telomérico**

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: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Dra. Maria Carolina Quartim  
Barbosa Elias Sabbaga

Co-orientador: Dra. Maria Isabel Nogueira  
Cano

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)

Pavani, Raphael Souza  
Análise funcional do complexo Replication  
Protein A em tripanossomatídeos e seu envolvimento  
com DNA telomérico / Raphael Souza Pavani;  
orientadora Maria Carolina Quartim Barbosa Elias  
Sabbaga; coorientadora Maria Isabel Nogueira Cano. -  
- São Paulo, 2019.  
152 p.

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

1. RPA. 2. Trypanosoma . 3. Metabolismo de DNA.  
4. Exportação nuclear. 5. Telômeros. I. Elias  
Sabbaga, Maria Carolina Quartim Barbosa,  
orientador. II. Cano, Maria Isabel Nogueira,  
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Raphael Souza Pavani.

Título da Tese: Análise funcional do complexo Replication Protein A em tripanossomatídeos e seu envolvimento com DNA telomérico.

Orientador: Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da 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](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 672/14 referente ao projeto intitulado: “*Análise funcional do complexo RPA em trypanosoma cruzi e seu envolvimento com DNA telomérico*” sob a responsabilidade de **Raphael Souza Pavani**, 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 nº466 de 2012.

São Paulo, 25 de junho de 2014.

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

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

**À minha mãe Marilene**

**À minha esposa Iamáris Malvestiti Pavani**

**Em memória ao meu pai Cláudio**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por abençoar a minha caminhada e me dar paz e sabedoria em momentos difíceis.

Gostaria também de agradecer a ciência, que me ensina diariamente a ser uma pessoa questionadora, crítica, curiosa e criativa. Todas essas características (que eu considero qualidades) são importantes não apenas para a vida profissional, mas influenciam diretamente a vida pessoal e a forma de enxergar o mundo.

À minha esposa Iamáris. Mãe, sou muito agradecido a Deus por ter uma pessoa como você do meu lado, você é incrível! Obrigado por todo amor, carinho e companheirismo que fazem os meus dias serem leves e maravilhosos. Obrigado também por todas as conversas, risadas e por compartilhar a alegria de viver. Sei que nossa nova fase que começará em breve será repleta de novidades, desafios e conquistas, e que tudo isso fortalecerá ainda mais o nosso companheirismo e sentimento. Eu te amo muito!

À minha mãe e meu pai, por todo amor e carinho com que me criaram e por todo apoio e suporte para eu chegar até aqui. Mãe, obrigado por passar uma boa parte da sua vida se dedicando a mim, comemorando comigo as minhas realizações e conquistas. O seu cuidado e amor comigo foram fundamentais para o meu desenvolvimento como pessoa. Obrigado por sempre apoiar minhas escolhas e por estar sempre presente. Eu te amo! Pai, a cada dia que se passa te acho um ser humano cada vez mais incrível, por tudo que você era e fez pela nossa família. Aonde quer que você esteja, tenho certeza que você está acompanhando os meus passos e vibrando com mais uma etapa da minha vida concluída.

À orientadora do meu doutorado, Carol Elias. Carol, tenho muito a te agradecer tanto no lado profissional, quanto no pessoal. No profissional, gostaria de dizer obrigado por toda atenção, dedicação e carinho pelo meu trabalho. Apesar de todas as reuniões, compromissos e outras diversas coisas que um pesquisador tem que resolver fora do laboratório, você esteve sempre presente e se empenhando em dar todo apoio possível para os seus alunos. Obrigado por toda a troca de ideias e discussões, pelas críticas construtivas, por me dar oportunidades e por sempre confiar no meu trabalho. No lado pessoal, obrigado por todos os conselhos, pelas valiosas dicas, conversas e direcionamentos. Te considero uma ótima profissional e

amiga, não tenho palavras para descrever o quanto aprendi e quantos bons momentos passei nestes 7 anos juntos. Com certeza irei sentir muito a sua falta.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório da Carol: Marcelo, você é um cara espetacular, obrigado por toda ajuda na vida profissional e pessoal. Te desejo todo o sucesso do mundo meu amigo. Simone, obrigado por toda a amizade e ajuda nos experimentos. Nossas conversas e discussões sempre foram muito produtivas, admiro muito você! Marcela, obrigado pela amizade, pelas nossas conversas e discussões, desejo um ótimo doutorado e muito sucesso na sua vida. Carla, muito obrigado pela ajuda, conselhos e risadas. Foi muito bom dividir a bancada nestes últimos tempos com você. Paulinha, parabéns pelo doutorado e desejo muito sucesso no retorno a Colômbia, aproveite bastante sua casa nova e que seus planos se realizem. Loyze, parabéns também pelo doutorado e boa sorte no pós doc, obrigado por todos os momentos no lab. Chris, apesar de você já não estar mais com a gente, convivemos bastante e gostaria de agradecer por todas as risadas e bons momentos. André, fico muito feliz por ter feito a ponte para trazer você para o nosso grupo. Você tem talento e bastante esforço, tenho certeza que você vai se dar muito bem na vida científica e me orgulho de poder estar participando disto. Obrigado pela amizade!

A todos os meus outros colegas de laboratório do LECC e do LETA. Aos companheiros de almoço Polly, Vincent, Ge e Diego (nos velhos tempos), obrigado pela companhia diária, pelas incríveis e variadas conversas e por toda a amizade, considero vocês demais, vão fazer muita falta. Aos demais integrantes do laboratório do Dr. Inácio: Úrsula, Nancy, Andrea, obrigado por toda ajuda. À Mari, por ser uma amigona, sempre fofa e disposta a ajudar tanto no trabalho quanto na vida pessoal, o meu muito obrigado. Ao Ivan, por nos ajudar com as compras, com os problemas no laboratório, com a manutenção dos equipamentos, enfim por resolver nossos problemas! Obrigado por toda ajuda e amizade. À dona Lídia, Eliana e Karin por sempre manterem o laboratório em ordem e sempre estarem disponíveis para ajudar. Aos membros do laboratório da Dra. Solange: Milene, Dilza, Dani, Debora, Carol (as duas), Eric e Ismael, muito obrigado pelo suporte e pela ajuda. Aos membros do laboratório do Dr. Pedro: Laura, Thiago (hey capitão), Bruna, Soraia, Andrea, Débora, Paula e Sandra por toda as conversas, diversão e por sempre suprir minha alimentação da tarde, brincadeira! Aos membros e ex-membros do laboratório da Dra. Júlia: Mariana, Francisca, Juliana, Saloe, Bárbara e Dr. Hugo:



Matheus, Cecília, Edu, Ed, obrigado por toda ajuda e amizade. Aos membros do laboratório do Dr. Léo, Dr. Marcelo, Dr. Milton, em especial ao Fábio que está sempre com a gente. Aos membros do laboratório da Dra. Mônica e Dra. Carla, em especial a Maria Alice, Adolfo, João e Leandro, que eu tenho mais contato. A todos os pesquisadores mencionados pelas conversas e frutíferas discussões.

Ao Dr. Mark Field e todos os membros do seu laboratório, que me receberam muito bem na Escócia. Muito obrigado Martin, Ric, Ning, Erin, Juan, ThankGod, Kayo por toda ajuda, colaboração e cuidado comigo. Um agradecimento a todos os membros e funcionários da BCDD, em especial a Catarina, Joana, Sandra, Sônia, Luciana e Viktor, pela amizade e carinho. Um grande obrigado também para a Dra. Lucia Guther, que me ajudou muito durante minha estadia em Dundee, muito obrigado por todas as dicas da Escócia e pelo constante cuidado e carinho.

À Dra. Maria Isabel Cano por, além de colaboradora e co-orientadora, ser uma pessoa muito especial, que está sempre em contato comigo e me cedeu a primeira oportunidade na ciência. Bel, tenho muito carinho por você, obrigado pelo seu apoio.

Ao meu grande amigo Dr. Carlos Fernandez, mais conhecido como Pituta, por todas a amizade, discussões científicas e grande ajuda na parte *in silico* do trabalho. Obrigado pela atenção e dedicação na colaboração e por estar sempre disponível e aberto para novas colaborações.

A todos os meus colaboradores: Dr. Stenio Fragoso (FIOCRUZ), Dra. Edilene Silva (UFPA), Dr. Sandro de Souza (UFRN), Dr. Carlos Renato (UFMG), Dr. Luiz Tosi (USP-RP) e seus respectivos grupos, por todos os experimentos em conjunto e discussões altamente produtivas. Agradeço de coração o empenho de vocês no meu trabalho.

À minha família e amigos, por todo o carinho e apoio.

Aos eternos membros da República Manguaça, meus irmãos de coração, que foram responsáveis por muito da minha criação fora de casa, cada um de vocês tem um espaço enorme reservado em mim.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro no início do projeto.

À FAPESP pelo suporte financeiro (2014 a 2019) que garantiu a possibilidade de realização do projeto, principalmente através dos processos 2014/02978-0 (Doutorado no país), 2016/24255-6 (Doutorado Sanduíche).



## RESUMO

PAVANI, R. S. "Análise funcional do complexo *Replication Protein A* em tripanossomatídeos e seu envolvimento com DNA telomérico". 2019. 152 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

*Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são protozoários parasitos responsáveis pela doença de Chagas e pela doença do sono, as quais resultam em um elevado número de mortes anualmente. Esses parasitos possuem um ciclo de vida complexo que alterna entre formas de vida replicativas e não replicativas. Apesar da caracterização de um grande número de vias moleculares nestes organismos, ainda existem muitas lacunas na compreensão dos processos que coordenam o metabolismo do DNA. A proteína *Replication Protein A* (RPA), principal ligante de fita simples de DNA de eucariotos, é um complexo heterotrimérico formado por três subunidades RPA-1, RPA2 e RPA-3 que participa em vários processos fundamentais como replicação, reparo e sinalização de *checkpoint*. A RPA de tripanossomatídeos apresenta peculiaridades estruturais significativas em comparação a outros eucariotos, como a falta de domínio de DBD-F (70N) que interage com proteínas majoritariamente envolvidas na resposta a danos no DNA (DDR) e substituições em resíduos de aminoácidos em regiões conservadas, levantando questões sobre a conservação de funções canônicas descritas em mamíferos e leveduras. Neste trabalho, mostramos que o RPA de tripanossomatídeos pode interagir com DNA fita simples e é de fato importante para replicação e resposta a danos de DNA. Além disso, conseguimos encontrar diversas novas características nas RPA de tripanossomatídeos, como a descoberta de (i) modificações pós-traducionais não descritas (ii) uma nova proteína *RPA-like* que parece ser exclusiva de tripanossomatídeos interagindo com o complexo RPA (iii) um processo de exportação nuclear ciclo de vida dependente e (iv) alta afinidade pelo DNA de fita simples telomérico rico em G.

**Palavras-chave:** RPA. *Trypanosoma*. Replicação. Danos de DNA. Telômeros.

## ABSTRACT

PAVANI, R. S. **Functional analysis of RPA complex in trypanosomatids and its involvement with telomeric DNA.** 2019. 152 p. PhD. Thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

*Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* are parasitic protozoa responsible for causing Chagas disease and sleeping sickness that result in a high number of deaths annually. These parasites present a complex life cycle that alternates between replicative and non-replicative lifeforms. Despite the characterization of a great number of molecular pathways, there are still many gaps in the understanding of the processes that coordinate the DNA metabolism of these organisms. Replication protein A (RPA), the major eukaryotic single-stranded binding protein, is a well-known heterotrimeric complex formed by three subunits RPA-1, RPA2, and RPA-3 that participates in various vital functions during replication, repair, and checkpoint signaling. RPA from trypanosomatids presents significant structural peculiarities compared to other eukaryotes such as the lacking of DBD-F (70N) domain that interacts with proteins majorly involved in DNA damage response (DDR) pathways and amino acids substitutions in conserved regions, raising questions regarding the conservation of canonical functions described in mammals and yeast. In this work, we show that RPA from trypanosomatids can interact with single-stranded DNA and is indeed important for replication and DNA damage response pathways. Moreover, we could find new features concerning trypanosomatids RPA such as the discovery of (i) non-described post-translation modifications (ii) a new RPA-like protein that seems to be exclusive of trypanosomatids interacting with RPA complex (iii) a nucleus-cytoplasm shuttle that is lifecycle dependent and (iv) high affinity for G-rich telomeric single stranded DNA.

**Keywords:** RPA. *Trypanosoma*. Replication. DNA damage. Telomeres



## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVO**

Neste primeiro capítulo, iniciaremos apresentando uma introdução geral, objetivos gerais e a motivação que tivemos para iniciar este projeto.

### **1.1 INTRODUÇÃO GERAL**

A introdução geral aborda os tripanossomatídeos utilizados neste trabalho e as respectivas doenças causadas por estes parasitos. Além disso, também introduzimos de forma geral a proteína Replication Protein A em eucariotos. As informações mais específicas de cada frente deste trabalho estão presentes nas introduções específicas de cada capítulo.

#### **1.1.1 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei***

Os tripanossomatídeos são um grupo de protozoários eucariotos unicelulares flagelados que pertencem a ordem Kinetoplastida. Os membros mais estudados deste grupo pertencem aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Sua principal característica para essa classificação é a presença do cinetoplasto, que consiste em uma estrutura auto-replicável presente na mitocôndria que contém uma grande e complexa rede de milhares de DNA circulares concatenados (kDNA), organizados em mini-círculos e maxi-círculos (LUKES et al., 2002). Neste trabalho, duas espécies de tripanossomatídeos foram utilizados como modelo de estudo: *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

O *T. cruzi* foi primeiramente descrito em abril de 1909 pelo pesquisador Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Em 1908, um novo trecho ferroviário estava sendo construído na Estrada de Ferro Central do Brasil no estado de Minas Gerais e o Dr. Carlos Chagas foi incumbido de realizar uma campanha anti-malária na região. Durante este período, o engenheiro-chefe Cantarino Motta alertou Carlos Chagas sobre um inseto hematófago popularmente conhecido como barbeiro, que poderia estar transmitindo alguma doença naquela região (COURA; COURA, 2013). Ao analisar o intestino destes insetos, Carlos Chagas encontrou organismos unicelulares flagelados e insetos infectados foram então enviados para o Dr. Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. Macacos da espécie *Callithrix penicillata* foram submetidos a picadas por estes insetos infectados e, após 20 a 30 dias, amostras de

sangue dos primatas foram analisadas e confirmaram a presença deste tripanossomatídeo em grande número, com uma morfologia diferente de espécies descritas anteriormente do gênero *Trypanosoma* (CHAGAS, 1909). Oswaldo Cruz entrou em contato imediatamente com Carlos, que retornou de Minas Gerais e realizou experimentos que confirmaram infecção em outros mamíferos e cultivou os parasitas em meio de cultura ágar-sangue. Posteriormente, Chagas nomeou este novo parasita de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz (COURA; COURA, 2013). Mais tarde, foi confirmado que esse parasita também é capaz de infectar seres humanos, causando uma doença que levou seu nome, a doença de Chagas.

A doença de Chagas é também conhecida como tripanossomíase americana, porque afeta principalmente países da América Latina. No entanto, nos últimos 40 anos, a doença de Chagas se tornou um problema de nível mundial e o número de casos reportados vêm aumentando (ANTINORI et al., 2017; BERN et al., 2011). A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 8 milhões de pessoas estão infectadas ao redor do mundo (WHO, 2018).

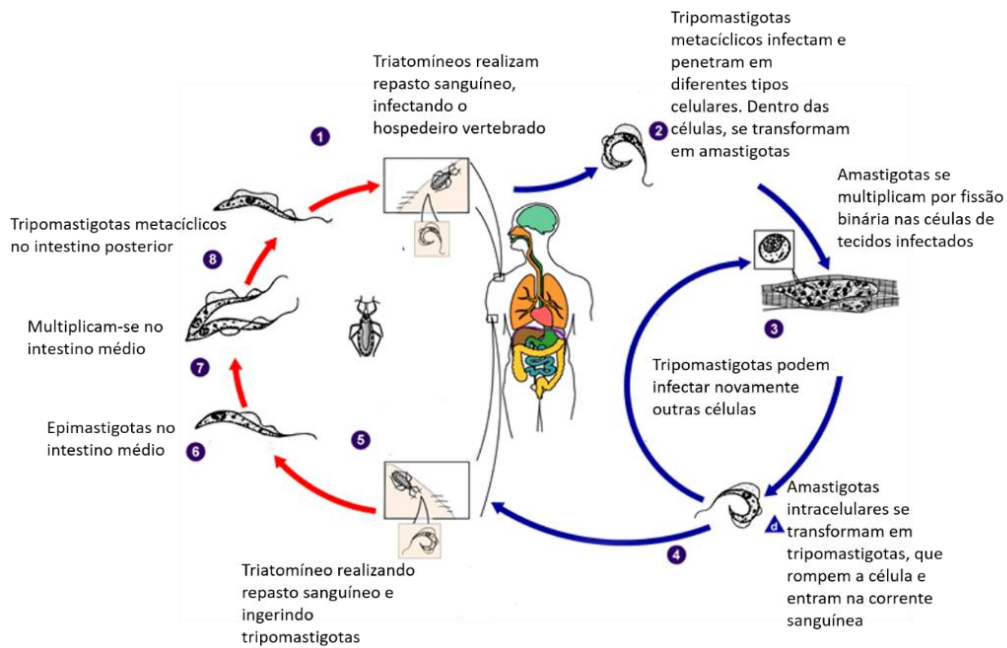
A Doença de Chagas é dividida em duas fases distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda ocorre pouco tempo após a infecção. Esta fase geralmente é assintomática ou apresenta sintomas leves como febre, fadiga, dor no corpo e na cabeça, que são normalmente confundidos com outras doenças. Com o passar do tempo, estes sintomas geralmente desaparecem, dificultando ainda mais um diagnóstico correto. Os marcadores mais reconhecidos da doença de Chagas aguda são: (i) uma reação inflamatória no local da penetração do parasito (inchaço), conhecida como chagoma e (ii) o inchaço das pálpebras perto da ferida da mordida, conhecido como sinal de Romaña (CDC, 2015). A fase aguda é perigosa em pessoas com o sistema imune deprimido. Durante a fase crônica, a infecção pode permanecer silenciada por décadas, porém algumas pessoas podem desenvolver complicações cardíacas como cardiomiopatia, (que se caracteriza pelo inchaço do coração), arritmia e falha cardíaca, podendo levar a morte súbita. Complicações no trato digestivo também são comuns desta fase, podendo ocorrer o alargamento do esôfago (megaesôfago) e do cólon intestinal (megacólon) (RASSI; RASSI; MARINETTO, 2010).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, com alternância de formas de vida replicativas (epimastigota e amastigota) e não-replicativas (tripomastigota

metacíclico e sanguícola). As formas epimastigotas se multiplicam no intestino do inseto e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. A infecção começa quando os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas excretas do inseto durante o repasto sanguíneo. Então, os tripomastigotas atingem a corrente sanguínea através de cortes na pele ou mucosas, causados pela picada do inseto, podendo atingir diversos tipos celulares. Uma vez no citoplasma da célula, os tripomastigotas se diferenciam em formas não flageladas conhecidas como amastigotas, que se replicam por fissão binária e diferenciam em formas tripomastigotas sanguícolas. Após lisar a célula hospedeira, os tripomastigotas podem circular na corrente sanguínea e infectar outros tecidos. Quando um inseto vetor se alimenta de um hospedeiro mamífero contaminado, ele ingere as formas tripomastigotas presentes no sangue, que se transformarão em epimastigotas no intestino do inseto e, assim, um novo ciclo se inicia (Figura 1) (revisado em TEIXEIRA et al., 2012). Apesar desta forma de transmissão do *T. cruzi* ser a mais conhecida, nos últimos anos diversos casos de infecção oral através da ingestão de alimentos contaminados como açaí e cana de açúcar vêm sendo reportados. Nestes casos, insetos contaminados são triturados junto aos alimentos em locais com higiene inadequada (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2017; YOSHIDA 2009). As espécies mais comuns de insetos vetores pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* e mais de cem espécies de mamíferos podem ser infectados pelo *T. cruzi*.

Com base em diversos marcadores genéticos e bioquímicos, as diferentes linhagens de *T. cruzi* foram divididas em seis tipos distintos, conhecidos como *Discrete Typing Units* (DTU), designados de TcI a TcVI (ZINGALES et al., 2009). As DTUs majoritariamente envolvidas no ciclo doméstico do *T. cruzi* são TcI, TcII, TcV e TcVI. Estes grupos estão diferentemente distribuídos na América, com TcI predominante na América Central e na região norte da América do Sul e TcII, TcV e TcVI mais comuns da região sul da América do Sul (ZINGALES et al., 2012). Embora esta nomenclatura continue sendo a mais utilizada, recentemente um grupo da França questionou essa definição e sugeriu uma classificação baseada em genes mitocondriais, separando em apenas 3 grupos: mtTcI, mtTcII and mtTcIII (BARNABÉ et al., 2016).





**Figura 1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre em um inseto vetor (setas vermelhas) e um hospedeiro vertebrado (setas azuis). Extraído de Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2015) com pequenas modificações.

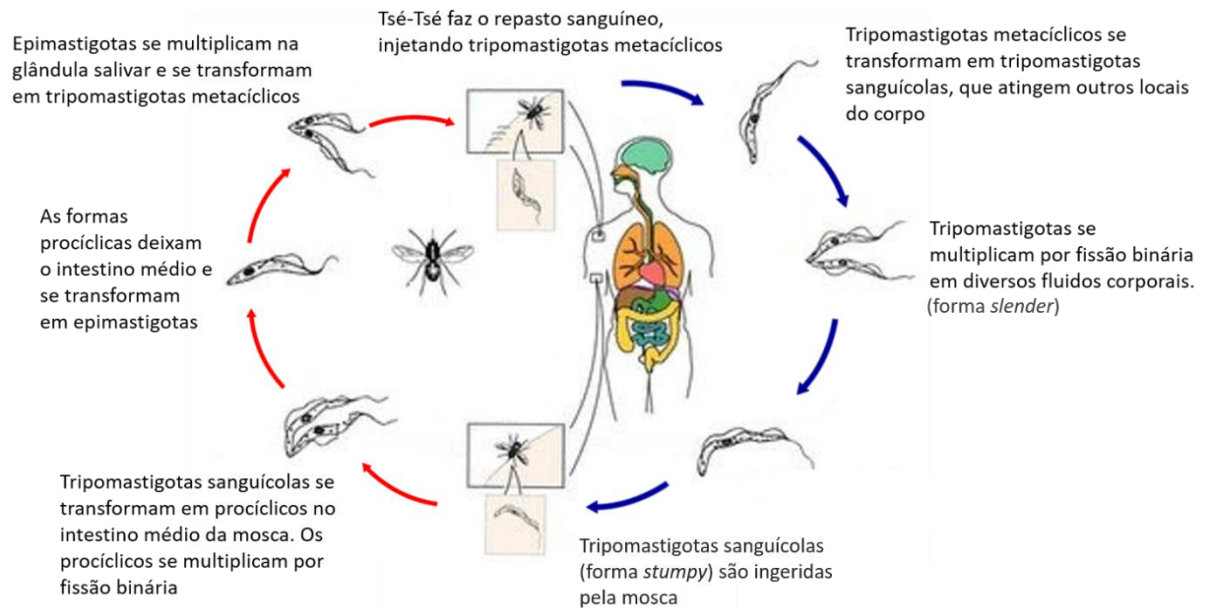
O *Trypanosoma brucei* é o agente etiológico da Tripanossomíase Humana Africana, conhecida como doença do sono principalmente por causar distúrbios de sono em pacientes afetados. Esta doença é endêmica na região sub-saariana da África, atingindo mais de 30 países. A transmissão do *T. brucei* a humanos ocorre pela picada de moscas infectadas do gênero *Glossina*, popularmente conhecidas como Tsé-Tsé (WHO, 2018).

A primeira sugestão de que mosca Tsé-Tsé poderia estar envolvida na transmissão de alguma doença veio do explorador e missionário escocês David Livingston, que relatou em 1852 a morte de uma grande quantidade de gado após terem sido picados por moscas Tsé-Tsé (STEVERDING, 2008). Em 1894, o médico patologista e microbiologista escocês David Bruce foi enviado à África do Sul para investigar a doença devastadora chamada de Nagana pela população local ou de “Doença da mosca” por viajantes e caçadores, que estava afetando os gados da região (COX, 2004). Em 1895, Bruce descobriu um tripanossomatídeo (que posteriormente foi chamado de *T. brucei* em sua homenagem) como principal agente causador desta enfermidade (BRUCE, 1895). A primeira observação do *T. brucei* em sangue humano foi feita por Robert Forde em 1901, ao examinar o capitão de um

navio da Gâmbia (FORDE 1902). Em 1903, Bruce conseguiu demonstrar que a o *T. brucei* era realmente transmitido pela mosca Tsé-Tsé (BRUCE; NABARRO 1903).

Hoje em dia, sabemos que duas subespécies de *T. brucei* são responsáveis por causar a doença do sono: *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*. O primeiro deles é responsável por 97% dos casos, enquanto o segundo é responsável por apenas 3% (WHO, 2018). A doença do sono apresenta dois estágios distintos: no primeiro, o parasito se multiplica nos tecidos subcutâneos, sangue e linfa, gerando febre, dores no corpo (especialmente nas juntas) e na cabeça e coceira; já no segundo, o parasito atravessa a barreira hematoencefálica, atingindo o sistema nervoso central, levando a mudanças no comportamento e causando confusão, distúrbios sensoriais e distúrbios no sono (WHO, 2018).

O *T. brucei* também possui um ciclo de vida complexo, alternando entre formas replicativas e não replicativas, porém sem estágio intracelular. Durante o repasto sanguíneo, a mosca infecta o hospedeiro mamífero com formas tripomastigotas metacíclicas, que atingem a linfa e corrente sanguínea, onde se diferenciam na forma tripomastigota sanguícola (chamada de *Slender*), que se multiplica por divisão binária e atinge diversas outras regiões do corpo, nos fluidos corporais. No processo de divisão, são geradas formas não replicativas conhecidas como *stumpy*, que são as formas ingeridas pelo vetor em novo repasto sanguíneo. Essas formas se diferenciam em formas procíclicas no intestino médio da mosca, onde se multiplicam e se diferenciam na forma tripomastigota metacíclica, capaz de infectar o hospedeiro mamífero, completando o ciclo de vida (CDC, 2018). A transmissão de mãe para filho também pode ocorrer, já que os tripanossomas conseguem atravessar a placenta (WHO, 2018).



**Figura 1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*.** O ciclo de vida do *T. brucei* ocorre em um inseto vetor (setas vermelhas) e um hospedeiro vertebrado (setas azuis). Extraído de Center for Disease Control and Prevention com pequenas modificações.

### 1.1.2 Biologia molecular dos tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos possuem diversas peculiaridades em sua biologia molecular quando comparados a outros eucariotos. Ausência de sequências promotoras, genes organizados em clusters direcionais densamente compactados expressos policistronicamente, transcrição de genes codificantes de proteínas pela RNA polimerase I, ocorrência de *trans-splicing* para geração de RNAs maduros e regulação da expressão gênica majoritariamente por controle pós transcricional são alguns exemplos (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; GÜNZL et al., 2003; LEE; VAN DER PLOEG, 1997; LIANG et al., 2003; MICHAELI, 2011).

Em 2005, a revista Science publicou em uma mesma edição os genomas do *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005a), *T. brucei* (BERRIMAN, 2005) e *Leishmania major* (IVENS et al., 2005), bem como um artigo comparativo arrematando similaridades e diferenças entre os genomas destes organismos (EL-SAYED, 2005b). Foi evidenciado que o genoma dos tripanossomatídeos possui uma grande escala de conservação genética e sintonia, evidenciando proximidade filogenética entre eles (EL-SAYED, 2005b). Análises de grupos de clusters de genes ortólogos mostraram que o *T. brucei* e *T. cruzi* são mais próximos evolutivamente, compartilhando 57% de identidade, enquanto *Leishmania* compartilha 44% com estes dois

tripanossomatídeos. Mesmo com esse grau de conservação, diversas inserções, deleções e substituições foram observadas entre as espécies, diversas delas dentro de regiões sintênicas. Curiosamente, inserções e substituições são mais comuns do que perdas gênicas (EL-SAYED, 2005b). Uma boa parte desses eventos pode resultar em diferenças fisiológicas e bioquímicas substanciais entre esses parasitos. Essas mudanças provavelmente estão relacionadas a pressões seletivas distintas de seus habitats e diferentes estratégias de sobrevivência desenvolvidas ao longo da evolução (EL-SAYED, 2005b).

O genoma haplóide sequenciado do *T. brucei* contém aproximadamente 26Mb, 11 cromossomos (megacromossomos) e aproximadamente 9.000 genes. Além disso, o genoma nuclear possui também um número não determinado de minicromossomos e cromossomos intermediários de 30 a 700kb, que foram excluídos desta conta. Aproximadamente 20% do genoma codifica genes subteloméricos, que em sua maioria são específicos do *T. brucei* e relacionados com a variação antigênica (BERRIMAN, 2005).

A linhagem escolhida para o sequenciamento do genoma de *T. cruzi* foi a *CL-Brener* (DTU TcVI), por já ter sido caracterizada experimentalmente (EL-SAYED et al., 2005a). O genoma haplóide desta cepa contém aproximadamente 55Mb, aproximadamente 28 cromossomos e é composto por aproximadamente 12.000 genes, com funções atribuídas a 50% deles (EL-SAYED et al., 2005a). Além disso, metade do genoma contém sequências repetitivas, como retrotransposons e genes de largas famílias multigênicas de proteínas de superfície como trans-sialidases, mucinas, gp63s e uma grande família de proteínas associadas a mucinas conhecidas como MASP (*mucin-associated surface protein*) (EL-SAYED et al., 2005a).

Desde os anos 80-90 é discutido e proposto que os cromossomos de parasitos são conservados em domínios centrais e polimórficos em suas extremidades, sugerindo alta plasticidade genômica (LANZER; FISCHER; LE BLANCQ, 1995; WALLIKER, 1989). De fato, as regiões subteloméricas possuem diversas características espécie-específicas, contendo distintos genes que formam a base da superfície celular dos diferentes parasitos (MORAES BARROS et al., 2012).

Desde o começo dos anos 2000, diversos autores evidenciaram a ocorrência de diferenças significativas no tamanho dos cromossomos e conteúdo de DNA entre linhagens de *T. cruzi* e, inclusive, entre diferentes clones dentro de uma mesma

população, sugerindo alta variabilidade genética nestes organismos (HENRIKSSON et al., 2002; LIMA et al., 2013; PEDROSO; CUPOLILLO; ZINGALES, 2003; TRIANA et al., 2006; VARGAS; PEDROSO; ZINGALES, 2004). O desenvolvimento de tecnologia de sequenciamentos de DNA de nova geração nos últimos anos permitiu o sequenciamento de diversos genomas de tripanossomatídeos com alta cobertura e baixo custo, com a geração de novas informações sobre eventos conhecidos como variação no número de cópias (*Copy number variation* – CNV) de determinados genes em *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. brucei*, decorrentes de amplificação gênica ou deleções (ARMENGOL et al., 2009; JACKSON et al., 2010; REIS-CUNHA et al., 2015; REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTHOLOMEU, 2018; ROGERS et al., 2011). Estas observações são interessantes, uma vez que o número de cópias está correlacionado com o nível de expressão de diversos genes em tripanossomatídeos (CLAYTON, 2016; REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTHOLOMEU, 2018). Além disso, fenômenos de variação no número de cópias de cromossomos vêm sendo reportados em *Leishmania* e *T. cruzi*, no qual um cromossomo inteiro pode ser duplicado ou perdido, gerando aneuploidias (DOWNING et al., 2011; REIS-CUNHA et al., 2015; REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTHOLOMEU, 2018; ROGERS et al., 2011; VALDIVIA et al., 2017). Eventos de troca de material genético entre células também resultam em variabilidade genética. Estratégias reprodutivas de protozoários parasitos foram objetos de debate por muitos anos, principalmente devido à dificuldade de observações diretas de reprodução sexuada (ROUGERON; DE MEEÛS; BAÑULS, 2017). Hoje, sabemos que eventos de troca genética entre indivíduos ocorrem em *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* (GAUNT et al., 2003; JENNI et al., 1986; KREUTZER et al., 1994). Recentemente, o processo de recombinação se mostrou importante para a realização e estabilização destas trocas, uma vez que a super-expressão da recombinase RAD51 aumentou significativamente o número de células híbridas em culturas de *T. cruzi* (ALVES et al., 2018).

Em soma, estes resultados evidenciam que a plasticidade genômica é uma característica marcante em tripanossomatídeos, provavelmente devido a necessidade de rápida adaptação a novos ambientes com diferentes pressões seletivas e a diversas condições de estresse que estes organismos precisam enfrentar. De fato, estudos recentes demonstram uma grande relação entre variabilidade genética e resistência a drogas nesses parasitos (CAMPOS et al., 2017; YASUR-LANDAU et al., 2018).

Os mecanismos moleculares que orquestram a geração de variabilidade genética estão diretamente relacionados com o metabolismo de DNA. Perturbações no processo de replicação de DNA são grande fonte de instabilidade genômica (BLUMENFELD; BEN-ZIMRA; SIMON, 2017). Falhas na resolução de estresse replicativo podem resultar em mutações pontuais, perda de heterozigose, inserções, deleções, translocações e aneuploidia (ARLT et al., 2009; GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015; ZHENG et al., 2016). O processo de reparo de DNA também está diretamente relacionado com a estabilidade genômica (WANG; LINDAHL, 2016). A inativação de vias de reparo gera aumento na taxa de mutação e aberrações cromossômicas. O câncer de cólon retal não poliposo é causado por defeitos na via de *Mismatch repair* (MMR) e a maioria dos casos de câncer de mama e ovário estão relacionados com mutações nos genes de BRCA1 e BRCA2, que controlam o reparo de quebra de dupla fita por recombinação homóloga (TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017). Aneuploidias são normalmente encontradas nestes tipos de câncer (MARTIN; WEBER, 2000; THOMAS, 1998; XU; HUANG; LI, 2016). O reparo de quebra de dupla fita também foi descrito como o principal regulador de plasticidade genômica em bactérias do gênero *Streptomyces* (HOFF et al., 2018). Diretamente ligado ao reparo e a replicação, o mecanismo de sinalização de danos coordenado principalmente pelas quinases PIKK como ATM, ATR e DNA-PK também vem se mostrando importante para o correta progressão do ciclo celular e manutenção da integridade cromossômica e estabilidade genômica (BROWN; BALTIMORE, 2000; DERHEIMER; KASTAN, 2010; LANG et al., 2016).

O conhecimento dos processos de replicação, reparo e reposta a danos de DNA em tripanossomatídeos ainda é limitado. O sequenciamento dos genomas permitiu o encontro de algumas proteínas homólogas participantes destes processos (EL-SAYED, 2005b). No entanto, muitas das proteínas identificadas possuem regiões altamente divergentes e diversas proteínas chave de vias conservadas não foram encontradas, sugerindo a possibilidade de diferentes proteínas, vias e mecanismos envolvidos no metabolismo de DNA desses parasitos (DA SILVA et al., 2017a; GENOIS et al., 2014; PASSOS-SILVA et al., 2010).

Além de auxiliar na compreensão da plasticidade genômica, o estudo de proteínas do metabolismo de DNA é fundamental para a compreensão de importantes eventos que ocorrem durante o ciclo de vida dos tripanossomatídeos. Por exemplo, os processos de parada de replicação nas formas infectivas ainda são

pouco compreendidos. A proteína ORC1/CDC6, fundamental para o reconhecimento de origens de replicação e montagem do complexo de pré-replicação, está presente no núcleo, porém sem estar ligada ao DNA nas formas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas (CALDERANO et al., 2014). Além disso, não foram encontrados níveis significativos da proteína MCM7 (componente da helicase replicativa MCM) nestas formas de vida, sugerindo que há um mecanismo de controle atuando nas proteínas de replicação em formas de vida não-replicativas (CALDERANO et al., 2014). A variação antigênica em *T. brucei* consiste em um interessante mecanismo onde, apesar de mais de 1000 genes codificantes para VSGs estarem presentes no genoma de *T. brucei*, apenas um é expresso por vez, sempre em uma região subtelomérica. Como forma de evadir o sistema imune do hospedeiro, o parasito realiza uma troca gênica no locus de expressão, trocando o gene codificante de VSG, expressando assim uma nova proteína VSG diferente da anterior (HORN, 2014; MCCULLOCH; MORRISON; HALL, 2015). Evidências sugerem que quebras de dupla fita, seguidas de reparo e recombinação na região subtelomérica estão diretamente envolvidos neste processo (GLOVER; HORN, 2014).

Desta forma, a geração de conhecimento na área do metabolismo de DNA em tripanossomatídeos, com a identificação e caracterização de proteínas participantes dos principais processos, é fundamental não apenas para o entendimento da evolução da célula eucariótica, mas também para compreensão de eventos específicos chave na biologia molecular de tripanossomatídeos. Neste trabalho identificamos e caracterizamos a Replication Protein A (RPA) de tripanossomatídeos, uma proteína que em eucariontes modelo é ligante de simples fita de DNA e extremamente importante para a célula, fundamental em diversos processos como replicação, recombinação e resposta a danos no DNA.

### **1.1.3 RPA: Estrutura e função**

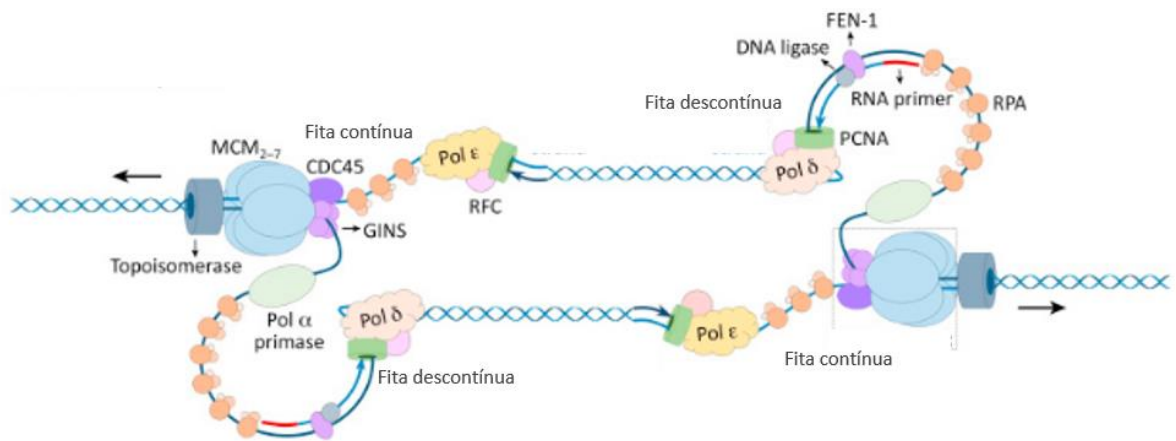
A proteína RPA foi primeiramente descrita em 1988 por Marc Wold e Thomas Kelly (WOLD; KELLY, 1988). Naquela época, os mecanismos envolvidos na replicação do DNA nos cromossomos eucarióticos ainda eram pouco compreendidos e havia uma grande dificuldade de estudar a replicação em células de mamífero devido a sua alta complexidade e limitações técnicas. Para contornar este problema, o laboratório do professor Kelly utilizou como estratégia estudar a replicação de genomas virais *in vitro*, desenvolvendo um sistema *cell free* que utilizava o DNA

genômico do vírus e extratos de células eucarióticas (CHALLBERG; KELLY; JR, 1979; LI; KELLY, 1984). O vírus símio 40 (SV40) foi um dos modelos utilizados por possuir um genoma pequeno que contém apenas uma origem de replicação e depender apenas de uma proteína viral conhecida como antígeno T para o início da replicação do DNA viral; os outros fatores necessários eram provenientes do extrato celular eucariótico (LI; KELLY, 1984). Com este sistema, Wold e Kelly conseguiram identificar, purificar e caracterizar um fator necessário para a iniciação e alongamento da replicação, que chamaram de *Replication protein A* (RPA) (WOLD; KELLY, 1988). Neste mesmo trabalho, os pesquisadores conseguiram elucidar que a RPA é um complexo heterotrimérico composto pelas subunidades RPA-1, RPA-2 e RPA-3 (ou RPA70, RPA32 e RPA14 de acordo com seu tamanho em kilodaltons) (WOLD; KELLY, 1988).

Hoje em dia, após 30 anos de sua descoberta, a RPA já foi amplamente estudada em organismos modelo como mamíferos e leveduras e é considerada a principal proteína ligante de fita simples de DNA de eucariotos. Devido a esta propriedade, a RPA atua na proteção, estabilização e processamento de intermediários de fita simples de DNA (ssDNA) que ocorrem durante diversos processos do metabolismo de DNA (CHEN; WOLD, 2014).

Durante o processo de replicação de DNA (Figura 1.3), a RPA é responsável por ligar a ssDNA presente na forquilha e auxiliar na denaturação da dupla fita de DNA adjacente (OAKLEY; PATRICK, 2010). Além disso, logo após a denaturação do DNA, a RPA auxilia no recrutamento, estimulação e aumento da processividade da enzima DNA polimerase alpha primase (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ; LAHERA; BLANCO, 2017). Durante a elongação, a RPA interage com proteínas como o *clamp* PCNA, estimula a atividade das polimerases delta e epsilon e auxilia no processamento dos fragmentos de Okazaki (BAE et al., 2001; HEDGLIN; BENKOVIC, 2017; LOOR et al., 1997; WAGA; STILLMAN, 1994).



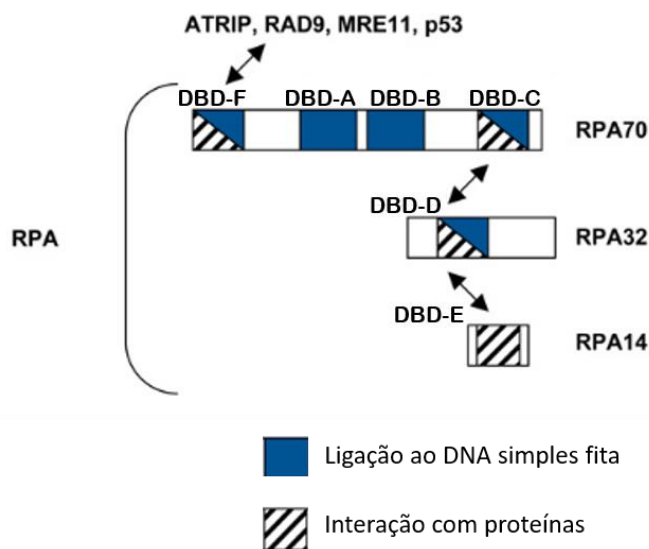


**Figura 1.3 Forquilha de replicação de DNA em eucariotos modelo.** Extraído de da Silva et al., 2017, com pequenas modificações.

A RPA também é uma peça fundamental na resposta a danos ao DNA (MARÉCHAL; ZOU, 2015; ZOU et al., 2006). Problemas na replicação do DNA e outros tipos de estresses genotóxicos são sinalizados durante o ciclo celular pela detecção de trechos persistentes de ssDNA ligados por RPA (ZOU et al., 2006). Nesse contexto, a quinase ATR é recrutada aos locais de dano através de seu parceiro obrigatório ATRIP, que interage diretamente com o domínio N-terminal da subunidade RPA-1. A ativação de ATR nos trechos RPA-ssDNA gera uma resposta de *checkpoint*, estabiliza forquilhas de replicação empacadas e promove o reparo do dano para a correta manutenção da integridade genômica (CIMPRICH; CORTEZ, 2008; MARÉCHAL; ZOU, 2013; ZOU; ELLEDGE, 2003). A RPA também está envolvida nas quatro vias majoritárias de reparo: reparo por excisão de nucleotídeos, reparo por excisão de bases, reparo de emparelhamento errôneo (*Mismatch*) e reparo de quebra de dupla fita (IYAMA; WILSON, 2013; KREJCI et al., 2012; LI, 2008; ZOU et al., 2006). Nestes processos, a RPA liga os intermediários de ssDNA formados e é capaz de recrutar e interagir com uma série de proteínas específicas de cada resposta (ZOU et al., 2006). Além dos processos acima descritos, diversos trabalhos vêm apontando funções de RPA na transcrição, no processamento e resolução de R-loops e na manutenção dos telômeros (a participação de RPA nos telômeros será abordada no capítulo 3) (AUDRY et al., 2015a; GRUDIC et al., 2007; NGUYEN et al., 2017; RUBTSOVA et al., 2009; SCHRAMKE et al., 2004; SIKORSKI et al., 2011; ZHANG et al., 2017). Mas como uma mesma proteína consegue

participar de tantos processos diferentes? Esta pergunta ainda está em aberto na comunidade científica, porém algumas evidências vêm sugerindo a idéia de que modificações pós-traducionais estão envolvidas na regulação de RPA em suas diferentes funções (discutido em detalhes na próxima seção).

A RPA é composta majoritariamente por domínios *oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold* (OB-fold). Apesar de divergentes em sua sequência, os domínios OB-fold possuem estrutura similar, formados por um  $\beta$ -barril (formado por 5 folhas  $\beta$  antiparalelas) coberto por uma  $\alpha$ -hélice em sua extremidade (FLYNN; ZOU, 2010; MURZIN, 1993; THEOBALD; MITTON-FRY; WUTTKE, 2003). Por serem responsáveis principalmente pela interação com o DNA simples fita, estes domínios na RPA também são conhecidos como DNA binding domains (DBD) e são classificados de A a F, de acordo com sua afinidade pelo ssDNA. Além disso, alguns destes OB-folds também são responsáveis pela interação de RPA com outras proteínas (Figura 3) (FLYNN; ZOU, 2010).



**Figura 1.4 Organização dos domínios OB-fold no complexo RPA.** Os domínios OB-fold estão distribuídos entre as três subunidades da RPA. Em azul, os OB-folds responsáveis pela interação com o ssDNA. Em listrado, os OB-folds responsáveis pela interação com proteínas. Os OB-folds em azul e listrado realizam os dois eventos. As setas simbolizam as interfaces de interação entre as proteínas do complexo ou, no caso do DBD-F, com proteínas parceiras (modificado de FLYNN;ZOU, 2010).

A maior subunidade do complexo é a RPA-1, que contém 4 domínios OB-fold, conhecidos como DBD-F (ou 70N), DBD-A, DBD-B e DBD-C (Figura 1.4). Os domínios DBD-A e DBD-B são os principais responsáveis pela interação da RPA com o DNA simples fita (BOCHKAREVA et al., 2001). O domínio DBD-F interage fracamente com o DNA simples fita e não participa significativamente na interação de RPA com esta estrutura, provavelmente por não conservar os resíduos

aromáticos envolvidos na alta afinidade por ssDNA. Contudo, este domínio é responsável pela interação de RPA com diversas proteínas envolvidas nos processos de resposta a danos de DNA e estresse replicativo como ATRIP, RAD9, MRE11 e p53 (Figura 1.4) (XU et al., 2008). Já o domínio DBD-C interage com o ssDNA apenas em determinadas condições, porém é importante para a trimerização do complexo (FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006; HARING et al., 2008) (Figura 1.4). Este domínio possui um motivo dedo de zinco, que apesar de não ser essencial para a ligação de RPA ao DNA, parece estar envolvido com a regulação desta interação frente ao estado redox da célula (PARK et al., 1999; YOU; WANG; LEE, 2000).

A RPA-2 contém o domínio OB-fold DBD-D que, assim como o DBD-C, interage com o ssDNA apenas em determinadas condições (tamanho da fita simples exposta por exemplo) (FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006). Este domínio é muito importante na trimerização do complexo, pois contém a interface de interação de RPA-2 com as subunidades RPA-1 e RPA-3 (FANNING; KLIMOVICH; NAGER, 2006). Além do domínio OB-fold, a RPA-2 contém em sua região C-terminal um domínio conhecido como *Winged Helix*, responsável por interagir com proteínas como UNG2, XPA, Rad52 e SMARCAL1 (CICCIA et al., 2009; MER et al., 2000; OAKLEY; PATRICK, 2010; UNSAL-KACMAZ et al., 2007).

Muito pouco se sabe em relação a subunidade RPA-3 do complexo, que parece estar envolvida principalmente na estabilidade do trímero RPA (CAVERO; LIMBO; RUSSELL, 2010). Diferentemente de RPA-1 e RPA-2, a ausência de RPA-3 não altera a viabilidade celular em leveduras, sugerindo que o heterodímero RPA-1-RPA-2 é suficiente para cumprir as funções essenciais durante o processo de replicação DNA. Entretanto, esta proteína se mostrou fundamental para sobrevivência celular frente a danos no DNA na fase S (CAVERO; LIMBO; RUSSELL, 2010).

#### **1.1.4 Modificações pós-traducionais do complexo RPA**

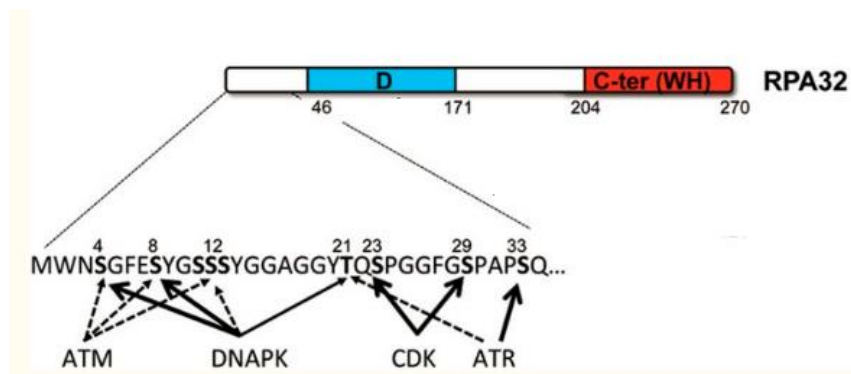
Como dito anteriormente, a RPA é alvo de múltiplas modificações pós-traducionais. Estas modificações vêm sendo implicadas na regulação do complexo RPA nas suas diferentes funções e na regulação de interações protéicas do complexo com proteínas parceiras.

A modificação pós-traducional mais estudada é a fosforilação de RPA-2, primeiramente descrita a mais de 20 anos atrás (DIN et al., 1990). Os primeiros 40 aminoácidos da região N-terminal desta subunidade contêm múltiplos resíduos de serina e treonina alvos de fosforilação por diferentes quinases (Figura 4) (MARÉCHAL; ZOU, 2015). A fosforilação das serinas 23 e 29 (S23 e S29) por CDKs foram identificadas durante a progressão do ciclo celular, com a fosforilação da S23 na fase S, e fosforilação de S23 e S29 durante o processo de mitose (STEPHAN et al., 2009).

Frente ao dano de DNA e estresse replicativo, a RPA-2 é hiperfosforilada (fosforilação de 5 ou mais resíduos) pelas quinases PIKK como ATR, ATM e DNA-PK. Experimentos sugerem que a ligação de RPA ao ssDNA é pré-requisito para a ocorrência destas modificações (FOTEDAR; ROBERTS, 1992). Em acordo com esta idéia, agentes químicos que induzem estresse replicativo com a produção de largos trechos de ssDNA induzem uma robusta fosforilação de RPA-2, enquanto agentes que geram quebras de dupla fita de DNA como fleomicina ou radiação ionizante, com a conseqüente exposição de trechos menores de ssDNA, induzem uma resposta de fosforilação mais modesta nesta subunidade (LIAW; LEE; MYUNG, 2011).

Estudos realizados com a troca dos sítios de fosforilação de RPA-2 por alaninas ou por aspartatos (estes últimos simulam a fosforilação devido a carga negativa) reúnem evidências da importância desta modificação para a regulação de RPA. Através do uso destas construções, foi concluído que a RPA hiperfosforilada perde a capacidade de co-localizar com centros de replicação, reduz a afinidade pela polimerase alpha primase e diminui significativamente a taxa de replicação do vírus SV40 *in vitro* (OAKLEY et al., 2003; OLSON et al., 2006; VASSIN; WOLD; BOROWIEC, 2004). As proteínas RAD51, RAD52, ATR e o complexo 911 (*clamp* semelhante ao PCNA importante para a ativação de *checkpoint*) também possuem maior afinidade pela forma hiperfosforilada de RPA *in vitro* (WU et al., 2005; WU; SHELL; ZOU, 2005). A fosforilação de RPA-2 também se mostrou importante como um evento precedente da poliubiquitinação de RPA frente ao estresse replicativo (DUBOIS et al., 2017). A poliubiquitinação de RPA é importante para a estabilização da forquilha de replicação, ativação de ATR e promoção do reparo por recombinação homóloga (DUBOIS et al., 2017; ELIA et al., 2015a; INANO et al., 2017).

Apesar de diversas evidências indicarem a fosforilação de RPA como uma resposta regulatória frente ao dano, a regulação fina desta modificação nos diversos sítios de fosforilação e suas implicações nos diferentes tipos de respostas a danos no DNA ainda é assunto de investigação em diversos laboratórios.



**Figura 1.5 Sítios de fosforilação de RPA-2.** A RPA-2 contém em sua região N-terminal múltiplos sítios de fosforilação. Os sítios de fosforilação estão destacados em negrito e as quinasas envolvidas em cada sítio estão representadas abaixo. As setas sólidas e pontilhadas indicam, respectivamente, uma maior ou menor contribuição para os sítios específicos. Extraído de Marechal e Zou 2015, com pequenas modificações.

Além da fosforilação e ubiquitinação, estudos recentes demonstraram que outras modificações pós-traducionais também estão envolvidas na regulação de RPA. Em 2010, Dou e colaboradores mostraram que a RPA-1 é sumoilada nas lisinas 449 e 557. A sumoilção de RPA aumenta a sua interação com RAD51 e aumenta a atividade de ATPase desta recombinase, contribuindo fundamentalmente para o reparo por recombinação homóloga (DOU et al., 2010). A acetilação também foi recentemente descrita na RPA-1, especificamente na lisina 163 após o dano induzido por UV. Esta modificação aumenta a interação de RPA com a proteína de reparo XPA e promove o reparo por excisão de nucleotídeos (HE; WANG; LIU, 2017; ZHAO et al., 2017).

## 1.2 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

Como mostrado na introdução geral, a RPA é uma proteína chave no metabolismo de DNA da célula eucariótica. Além de proteger a fita simples de DNA, esta proteína orchestra diversos processos importantes para integridade genômica. Como veremos adiante, a RPA de tripanossomatídeos possui diferenças estruturais relevantes quando comparada com a RPA de eucariotos modelo, gerando dúvidas

em relação ao seu envolvimento nas diversas vias descritas em outros organismos. Apesar de alguns trabalhos realizados em *Leishmania* e dados anteriores do nosso grupo em *T. cruzi* apontarem um papel de RPA-1 na manutenção dos telômeros, aspectos fundamentais como a formação do complexo RPA, sua ligação ao DNA simples fita e seu envolvimento nos diferentes processos do metabolismo do DNA ainda são obscuros em tripanossomas. Desta forma, neste trabalho buscamos caracterizar e elucidar a participação de RPA nos mecanismos de replicação e resposta a danos de DNA, bem como confirmar e analisar a sua alta afinidade pelo DNA telomérico e sua interação com esta região, sugerida em alguns experimentos durante o meu trabalho de mestrado.

Desta forma, nossos objetivos gerais são:

- Caracterizar o complexo RPA e seu envolvimento nos processos celulares e no metabolismo de DNA.
- Aprofundar o entendimento da interação RPA-telômero em tripanossomatídeos.

### **1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE**

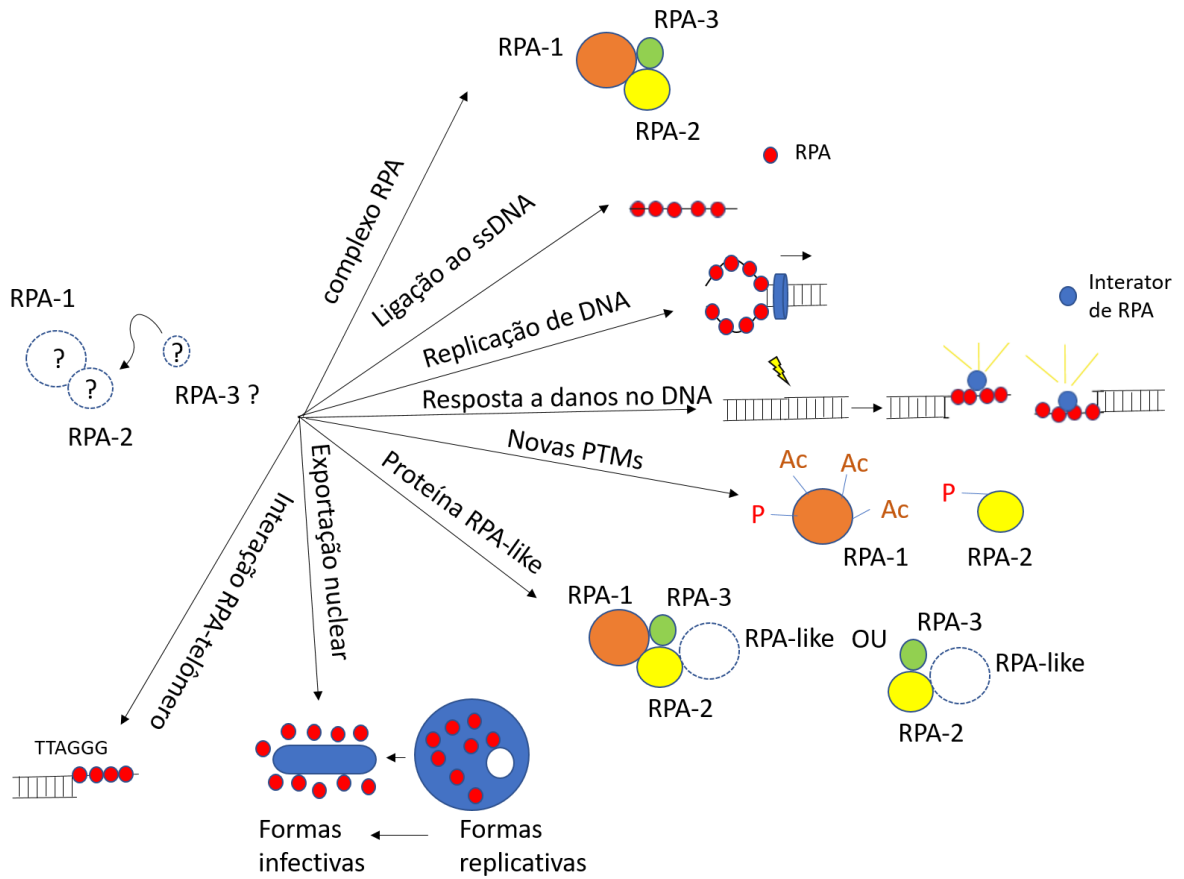
Para facilitar a compreensão do leitor, este trabalho foi dividido em quatro capítulos. Neste primeiro, introduzimos o trabalho de forma geral e apresentamos seus objetivos. Os dois capítulos seguintes são compostos por uma pequena introdução específica, metodologia e resultados. No segundo capítulo, buscamos caracterizar de forma geral o complexo RPA por várias abordagens, utilizando os parasitos *T. cruzi* e *T. brucei*. No terceiro capítulo, buscamos aprofundar a compreensão da interessante relação de RPA com o DNA telomérico em *T. cruzi*. O quarto capítulo consiste em uma discussão geral de todos os resultados produzidos e considerações finais. Segue-se então a bibliografia contendo as referências utilizadas neste trabalho e anexos.

## 4.2 Considerações finais

Iniciamos este trabalho com basicamente nenhuma informação sobre o complexo RPA em tripanossomatídeos patogênicos. As poucas informações existentes na literatura foram produzidas apenas em *Leishmania*, focados principalmente na interação de RPA-1 com telômeros. A subunidade RPA-2 nunca havia sido caracterizada e a existência de RPA-3 era uma questão aberta. Além disso, trabalhos endereçando o complexo RPA em *T. cruzi* e *T. brucei* não foram encontrados. A figura 4.2 sumariza os avanços obtidos com a realização deste trabalho. Através de um grande conjunto de experimentos, pudemos evidenciar que assim como em outros eucariotos, RPA de tripanossomatídeos forma complexo e participa de processos convencionais do metabolismo de DNA como replicação e resposta a danos. Apesar desta conservação de função, as modificações pós-traducionais encontradas sugerem que a regulação de RPA em tripanossomatídeos ocorre de forma diferente do descrito para leveduras e mamíferos. Além disso, a identificação de proteínas parceiras de RPA levantou possibilidades de envolvimento desta proteína em diferentes processos como o metabolismo de RNA e organização da cromatina. A identificação de uma nova proteína RPA-like interagindo com RPA-2 abriu uma nova perspectiva para este complexo em tripanossomas, com a possível formação de múltiplos complexos RPA nestes organismos. Apesar de dados adicionais serem necessários para o preciso endereçamento da função desta nova proteína identificada, ela se mostrou importante para a estabilidade genômica e correta progressão do ciclo celular. Em outra frente do trabalho, conseguimos identificar o processo de exportação nuclear do complexo RPA de forma ciclo de vida dependente, nunca descrito na literatura para nenhum organismo. Por fim, realizamos experimentos que confirmaram a alta afinidade de RPA de *T. cruzi* pelo DNA telomérico, co-localização com telômeros em diversas fases do ciclo celular e interação diferencial de RPA-1 com esta região, evidenciada pelas mudanças na estrutura secundária desta proteína na interação específica com a sequência telomérica.

Todos estes resultados em conjunto demonstram que a RPA de tripanossomatídeos é uma proteína multifuncional, que apresenta diversas características únicas quando comparadas as RPA de eucariotos modelo. Portanto, o aprofundamento do estudo deste complexo nestes organismos pode vir a revelar

vias específicas e ainda desconhecidas, que foram selecionadas ao longo de milhares de anos de evolução para orquestrar o peculiar metabolismo de DNA destes parasitos.



**Figura 4.2 Resumo dos avanços alcançados neste projeto em relação ao complexo RPA de tripanosomatídeos.** No início deste trabalho, diversas lacunas existiam em relação ao complexo RPA de tripanosomatídeos. As setas sumarizam os avanços obtidos neste trabalho.



## REFERÊNCIAS\*

- ALVES, C. L. et al. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13335, 2018.
- ANDERSON, E. M.; HALSEY, W. A.; WUTTKE, D. S. Delineation of the high-affinity single-stranded telomeric DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 19, p. 4305–13, 2002.
- ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6–15, 2017.
- APPIKONDA, S. et al. Cross-talk between chromatin acetylation and SUMOylation of tripartite motif-containing protein 24 (TRIM24) impacts cell adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 19 p. 7476-7485, 2018.
- ARLT, M. F. et al. Replication Stress Induces Genome-wide Copy Number Changes in Human Cells that Resemble Polymorphic and Pathogenic Variants. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 3, p. 339–350, 2009.
- ARMENGOL, L. et al. Identification of Copy Number Variants Defining Genomic Differences among Major Human Groups. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7230, 2009.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, 2010.
- AUDRY, J. et al. RPA prevents G-rich structure formation at lagging-strand telomeres to allow maintenance of chromosome ends. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 14, p. 1942–1958, 2015.
- BAE, S.-H. et al. RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. **Nature**, v. 412, n. 6845, p. 456–461, 2001.
- BALAJEE, A. S.; GEARD, C. R. Replication protein A and gamma-H2AX foci assembly is triggered by cellular response to DNA double-strand breaks. **Experimental cell research**, v. 300, n. 2, p. 320–34, 2004.
- BARNABÉ, C. et al. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 176–186, 2016.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1, p. 43–56, 1995.

---

\* De acordo com :  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERN, C. et al. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 655–81, 2011.

BERRIMAN, M. The Genome of the African Trypanosome Trypanosoma brucei. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.

BIANCHI, A.; SHORE, D. How Telomerase Reaches Its End: Mechanism of Telomerase Regulation by the Telomeric Complex. **Molecular Cell**, v. 31, n. 2, p. 153–165, 2008.

BIANCHI, V.; PONTIS, E.; REICHARD, P. Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 34, p. 16037–42, 1986.

BLUMENFELD, B.; BEN-ZIMRA, M.; SIMON, I. Perturbations in the Replication Program Contribute to Genomic Instability in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1138, 2017.

BOCHKAREV, A. et al. Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. **Nature**, v. 385, n. 6612, p. 176–81, 1997.

BOCHKAREVA, E. et al. Structure of the major single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. **The EMBO journal**, v. 20, n. 3, p. 612–8, 2001.

BOCHKAREVA, E. et al. Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. **The EMBO journal**, v. 21, n. 7, p. 1855–63, 2002.

BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. **Genes & development**, v. 14, n. 4, p. 397–402, 2000.

BROWN, G. W.; MELENDY, T. E.; RAY, D. S. Conservation of structure and function of DNA replication protein A in the trypanosomatid Crithidia fasciculata. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 21, p. 10227–31, 1992.

BRUCE D. Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand. **Durban: Bennett and Davis**; 1895.

BRUCE D.; NABARRO D. Can the Uganda tsetse fly carry the trypanosome found in sleeping sickness from animal to animal? **Report of the Sleeping Sickness Commission**, v. 1, p. 11-88 (1903)

BYUN, T. S. et al. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. **Genes & Development**, v. 19, n. 9, p. 1040–1052, 2005.

CHAGAS, C. Nova trypanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo

evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen. Sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CALDERANO, S. et al. ORC1/CDC6 and MCM7 distinct associate with chromatin through *Trypanosoma cruzi* life cycle. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 193, n. 2, p. 110–3, 2014.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 6, p. 93–100, 1964.

CAMPOS, M. C. et al. Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 14407, 2017.

CAMPOS, P. C. et al. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 176, n. 1, p. 8–16, 2011.

CAVERO, S.; LIMBO, O.; RUSSELL, P. Critical functions of Rpa3/Ssb3 in S-phase DNA damage responses in fission yeast. **PLoS genetics**, v. 6, n. 9, p. e1001138, 2010.

CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2015 Parasite- American Tripanosomiasis (Chagas Disease). Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 15 dez 2018

CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2018 Parasite- African Tripanosomiasis (Sleeping sickness). Disponível em <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>>. Acesso em: 15 dez 2018

CHALLBERG, M. D.; KELLY, T. J.; JR. Adenovirus DNA replication in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 2, p. 655–9, 1979.

CHAN, S. R. W. L.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109–21, 2004.

CHEN, A. et al. SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 895–911, 2006.

CHEN, J. et al. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 11, p. 3781–90, 2008.

CHEN, L.-Y.; LINGNER, J. CST for the grand finale of telomere replication. **Nucleus**, v. 4, n. 4, p. 277–82, 2013.

CHEN, L.-Y.; REDON, S.; LINGNER, J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 540–544, 2012.

CHEN, R.; WOLD, M. S. Replication protein A: Single-stranded DNA's first responder. **BioEssays**, v. 36, n. 12, p. 1156–1161, 2014.

CHIURILLO, M. A. et al. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 100, n. 2, p. 173–83, 1999.

CHIURILLO, M. A. et al. An improved general approach for cloning and characterizing telomeres: the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* as model organism. **Gene**, v. 294, n. 1–2, p. 197–204, 2002.

CHOI, K. H. et al. The OB-fold domain 1 of human POT1 recognizes both telomeric and non-telomeric DNA motifs. **Biochimie**, v. 115, p. 17–27, 2015.

CICCIA, A. et al. The SIOD disorder protein SMARCAL1 is an RPA-interacting protein involved in replication fork restart. **Genes & Development**, v. 23, n. 20, p. 2415–2425, 2009.

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

CLAYTON, C. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93–101, 2007.

CONTRERAS, V. T. et al. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123–33, 1988.

CORTEZ, D. Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling. **Genes & development**, v. 19, n. 9, p. 1007–12, 2005.

COURA, J. R.; COURA, J. R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 389–390, 2013.

COX, F. E. . History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 231–245, 2004.

CUEVAS, I. C.; FRASCH, A. C. C.; D'ORSO, I. Insights into a CRM1-mediated RNA-nuclear export pathway in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 15–24, 2005.

DA SILVA, M. S. et al. The Leishmania amazonensis TRF (TTAGGG repeat binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 136, 2010.

DA SILVA, M. S. et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 11, 2017a.

DA SILVA, M. S. et al. Consequences of acute oxidative stress in Leishmania amazonensis: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, 2017b.

DA SILVEIRA, R. D. C. V. et al. The natural absence of RPA1N domain did not impair Leishmania amazonensis RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection. **Parasitology**, v. 140, n. 4, p. 547–59, 2013.

DAMASCENO, J. D.; NUNES, V. S.; TOSI, L. R. O. LmHus1 is required for the DNA damage response in Leishmania major and forms a complex with an unusual Rad9 homologue. **Molecular microbiology**, v. 90, n. 5, p. 1074–87, 2013.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 2005.

DEAN, S. et al. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. **Open biology**, v. 5, n. 1, p. 140197, 2015.

DEAN, S.; SUNTER, J. D.; WHEELER, R. J. TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 2, p. 80–82, 2017.

DERHEIMER, F. A.; KASTAN, M. B. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. **FEBS letters**, v. 584, n. 17, p. 3675–81, 2010.

DICKEY, T. H.; ALTSCHULER, S. E.; WUTTKE, D. S. Single-Stranded DNA-Binding Proteins: Multiple Domains for Multiple Functions. **Structure**, v. 21, n. 7, p. 1074–1084, 2013.

DIN, S. et al. Cell-cycle-regulated phosphorylation of DNA replication factor A from human and yeast cells. **Genes & development**, v. 4, n. 6, p. 968–77, 1990.

DONG, X. et al. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1136–41, 2009..

DOU, H. et al. Regulation of DNA Repair through DeSUMOylation and SUMOylation of Replication Protein A Complex. **Molecular Cell**, v. 39, n. 3, p. 333–345, 2010..

DOWNING, T. et al. Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143–2156, 2011.

DUBOIS, J.-C. et al. A phosphorylation-and-ubiquitylation circuitry driving ATR activation and homologous recombination. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 15, p. 8859–8872, 2017.

EL-SAYED, N. M. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005a.

EL-SAYED, N. M. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005b.

ELIA, A. E. H. et al. RFWD3-Dependent Ubiquitination of RPA Regulates Repair at Stalled Replication Forks. **Molecular Cell**, v. 60, n. 2, p. 280–293, 2015.

ELIAS, M. et al. Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. **Protist**, v. 158, n. 2, p. 147–157, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185034>>. Acesso em: 1 mar. 2017.

ELIAS, M. C. et al. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79–90, 2001.

ELIAS, M. C. Q. B. et al. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 6, p. 944–53, 2002.

FAN, J.; PAVLETICH, N. P. Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. **Genes & development**, v. 26, n. 20, p. 2337–47, 2012.

FANNING, E.; KLIMOVICH, V.; NAGER, A. R. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 15, p. 4126–37, 2006.

FERNÁNDEZ, M. F. et al. Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 271, n. 14, p. 3050–63, 2004.

FERREIRA, L. R. P. et al. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 157–66, 2008.

FLYNN, R. L.; ZOU, L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 45, n. 4, p. 266–75, 2010.

FORDE RM. Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosome was observed. **Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 261–263, 1902.

FORNEROD, M. et al. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1051–60, 1997.

FOTEDAR, R.; ROBERTS, J. M. Cell cycle regulated phosphorylation of RPA-32 occurs within the replication initiation complex. **The EMBO journal**, v. 11, n. 6, p. 2177–87, 1992.

FU, S.-C. et al. ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D338–D343, 2013.

GAILLARD, H.; GARCÍA-MUSE, T.; AGUILERA, A. Replication stress and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 5, p. 276–289, 2015.

GAO, H. et al. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 14, n. 3, p. 208–214, 2007.

GAUNT, M. W. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936–939, 2003.

GELINAS, A. D. et al. Telomere capping proteins are structurally related to RPA with an additional telomere-specific domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 46, p. 19298–303, 2009.

GENOIS, M.-M. et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 78, n. 1, p. 40–73, 2014..

GIRAUD-PANIS, M.-J. et al. CST Meets Shelterin to Keep Telomeres in Check. **Molecular Cell**, v. 39, n. 5, p. 665–676, 2010.

GLOVER, L.; HORN, D. Trypanosomal histone  $\gamma$ H2A and the DNA damage response. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 183, p. 78–83, 2012.

GLOVER, L.; HORN, D. Locus-specific control of DNA resection and suppression of subtelomeric VSG recombination by HAT3 in the African trypanosome. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 20, p. 12600–13, 2014.

GLUSTROM, L. W. et al. Single-stranded telomere-binding protein employs a dual rheostat for binding affinity and specificity that drives function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 41, p. 10315–10320, 2018.

GOMEZ, D. E. et al. Telomere structure and telomerase in health and disease. **International journal of oncology**, v. 41, n. 5, p. 1561–9, 2012.

GONÇALVES, C. S. et al. Revisiting the Trypanosoma cruzi metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 83, 2018.

GOPALAKRISHNAN, A. M.; KUMAR, N. Opposing Roles for Two Molecular Forms of Replication Protein A in Rad51-Rad54-Mediated DNA Recombination in Plasmodium falciparum. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.

GOTTIPATI, P. et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is Hyperactivated in Homologous Recombination–Defective Cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 13, p. 5389–5398, 2010.

GREETHAM, M. et al. The Telomere Binding Protein Cdc13 and the Single-Stranded DNA Binding Protein RPA Protect Telomeric DNA from Resection by Exonucleases. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 19, p. 3023–30, 2015.

GREIDER, C. W. Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model. **Genes & Development**, v. 30, n. 13, p. 1483–1491, 2016.

GRUDIC, A. et al. Replication protein A prevents accumulation of single-stranded telomeric DNA in cells that use alternative lengthening of telomeres. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 21, p. 7267–78, 2007.

GÜNZL, A. et al. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 3, p. 542–51, 2003.

HAAS, J. et al. The Protein Model Portal--a comprehensive resource for protein structure and model information. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2013, p. bat031, 2013.

HARING, S. J. et al. Cellular functions of human RPA1. Multiple roles of domains in replication, repair, and checkpoints. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 19095–111, 2008.

HASS, C. S.; LAM, K.; WOLD, M. S. Repair-specific Functions of Replication Protein A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 3908–3918, 2012.

HE, H.; WANG, J.; LIU, T. UV-Induced RPA1 Acetylation Promotes Nucleotide Excision Repair. **Cell Reports**, v. 20, n. 9, p. 2010–2025, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28854355>>. Acesso em: 23 fev. 2018.

HECKER, C.-M. et al. Specification of SUMO1-and SUMO2-interacting Motifs. **the Journal of Biological Chemistry**, v.281, n. 23, p. 16117-27, 2006.

HEDGLIN, M.; BENKOVIC, S. J. Replication Protein A Prohibits Diffusion of the PCNA Sliding Clamp along Single-Stranded DNA. **Biochemistry**, v. 56, n. 13, p. 1824–1835, 2017.

HENRIKSSON, J. et al. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. **Parasitology**, v. 124, n. Pt 3, p. 277–86, 2002.

HEYLMANN, D.; KAINA, B. The  $\gamma$ H2AX DNA damage assay from a drop of blood. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22682, 2016.

HOFF, G. et al. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5272, 2018.



HORN, D. Antigenic variation in African trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 123–129, 2014.

HUTTEN, S.; KEHLENBACH, R. H. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 193–201, 2007.

INANO, S. et al. RFW3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. **Molecular Cell**, v. 66, n. 5, p. 622–634.e8, 2017.

ISHIBASHI, T. et al. Two types of replication protein A 70 kDa subunit in rice, *Oryza sativa*: molecular cloning, characterization, and cellular & tissue distribution. **Gene**, v. 272, n. 1–2, p. 335–43, 2001.

ISHIBASHI, T. et al. Two types of replication protein A in seed plants. **FEBS Journal**, v. 272, n. 13, p. 3270–3281, 2005.

ISHIBASHI, T.; KIMURA, S.; SAKAGUCHI, K. A Higher Plant Has Three Different Types of RPA Heterotrimeric Complex. **Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 1, p. 99–104, 2006.

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

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, v. 12, n. 8, p. 620–636, 2013.

JACKSON, A. P. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma brucei gambiense*, Causative Agent of Chronic Human African Trypanosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e658, 2010.

JEHI, S. E.; WU, F.; LI, B. *Trypanosoma brucei* TIF2 suppresses VSG switching by maintaining subtelomere integrity. **Cell Research**, v. 24, n. 7, p. 870–885, 2014.

JENNI, L. et al. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. **Nature**, v. 322, n. 6075, p. 173–175, 1986.

KABECHE, L. et al. A mitosis-specific and R loop–driven ATR pathway promotes faithful chromosome segregation. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 108–114, 2018.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–58, 2015.

KIBE, T. et al. Fission Yeast Taz1 and RPA Are Synergistically Required to Prevent Rapid Telomere Loss. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 6, p. 2378–2387, 2007.

KOURY, E.; HARRELL, K.; SMOLIKOVE, S. Differential RPA-1 and RAD-51 recruitment in vivo throughout the *C. elegans* germline, as revealed by laser

microirradiation. **Nucleic acids research**, v. 46, n. 2, p. 748–764, 2018.

KREJCI, L. et al. Homologous recombination and its regulation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 13, p. 5795–5818, 2012.

KREUTZER, R. D. et al. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 51, n. 3, p. 301–7, 1994.

KUTAY, U.; GÜTTINGER, S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 121–124, 2005.

LAMARCHE, B. J.; ORAZIO, N. I.; WEITZMAN, M. D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3682–3695, 2010.

LANG, P. Y. et al. ATR maintains chromosomal integrity during postnatal cerebellar neurogenesis and is required for medulloblastoma formation. **Development**, v. 143, n. 21, p. 4038–4052, 2016.

LANZER, M.; FISCHER, K.; LE BLANCQ, S. M. Parasitism and chromosome dynamics in protozoan parasites: is there a connection? **Molecular and biochemical parasitology**, v. 70, n. 1–2, p. 1–8, 1995.

LEE, M. G.-S.; VAN DER PLOEG, L. H. T. TRANSCRIPTION OF PROTEIN-CODING GENES IN TRYPANOSOMES BY RNA POLYMERASE I. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 463–489, 1997.

LEI, M.; PODELL, E. R.; CECH, T. R. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 12, p. 1223–1229, 2004.

LEWIS, K. A.; WUTTKE, D. S. Telomerase and Telomere-Associated Proteins: Structural Insights into Mechanism and Evolution. **Structure**, v. 20, n. 1, p. 28–39, 2012.

LI, B.; ESPINAL, A.; CROSS, G. A. M. Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 12, p. 5011–21, 2005.

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

LI, J. J.; KELLY, T. J. Simian virus 40 DNA replication in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 22, p. 6973–7, 1984.

LIANG, X. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830–40, 2003.

LIAW, H.; LEE, D.; MYUNG, K. DNA-PK-Dependent RPA2 Hyperphosphorylation Facilitates DNA Repair and Suppresses Sister Chromatid Exchange. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21424, 2011.

LIMA, F. M. et al. Interclonal variations in the molecular karyotype of *Trypanosoma cruzi*: chromosome rearrangements in a single cell-derived clone of the G strain. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63738, 2013.

LIRA, C. B. B. et al. DNA and heparin chaperone the refolding of purified recombinant replication protein A subunit 1 from *Leishmania amazonensis*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1790, n. 2, p. 119–25, 2009.

LISBY, M.; ROTHSTEIN, R. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. **DNA repair**, v. 8, n. 9, p. 1068–76, 2009.

LIU, J.-S.; KUO, S.-R.; MELENDY, T. DNA damage-induced RPA focalization is independent of  $\gamma$ -H2AX and RPA hyper-phosphorylation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1452–1462, 2006.

LOOR, G. et al. Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 5041–6, 1997.

LOVELL, S. C. et al. Structure validation by  $C\alpha$  geometry:  $\phi, \psi$  and  $C\beta$  deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 2003..

LU, W. et al. Telomeres-structure, function, and regulation. **Experimental cell research**, v. 319, n. 2, p. 133–41, 2013.

LUCIANO, P. et al. RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. **The EMBO journal**, v. 31, n. 8, p. 2034–46, 2012.

LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryotic cell**, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.

MACKERELL, A. D.; BANAVALI, N. K. All-atom empirical force field for nucleic acids: II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 105–120, 2000.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 9, 2013.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. **Cell Research**, v. 25, n. 1, p. 9–23, 2015.

MARIN, P. A. et al. Recruitment kinetics of the homologous recombination pathway in procyclic forms of *trypanosoma brucei* after ionizing radiation treatment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

MARTIN, A. M.; WEBER, B. L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer.

**Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 14, p. 1126–35, 2000.

MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, M. I.; LAHERA, A.; BLANCO, L. Human PrimPol activity is enhanced by RPA. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 783, 2017.

MCCULLOCH, R.; MORRISON, L. J.; HALL, J. P. J. DNA Recombination Strategies During Antigenic Variation in the African Trypanosome. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2 p. 409–435, 2015.

MER, G. et al. Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 449–56, 2000.

MICHAELI, S. *Trans*-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459–474, 2011.

MILLERSHIP, J. J.; ZHU, G. Heterogeneous expression and functional analysis of two distinct replication protein A large subunits from *Cryptosporidium parvum*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1477–1485, 2002.

MIN, B.; COLLINS, K. An RPA-Related Sequence-Specific DNA-Binding Subunit of Telomerase Holoenzyme Is Required for Elongation Processivity and Telomere Maintenance. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 609–619, 2009.

MORAES BARROS, R. R. et al. Anatomy and evolution of telomeric and subtelomeric regions in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 229, 2012.

MURZIN, A. G. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. **The EMBO journal**, v. 12, n. 3, p. 861–7, 1993.

NETO, J. L. S. et al. Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 2, p. 417–23, 2007.

NGUYEN, H. D. et al. Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH1. **Molecular Cell**, v. 65, n. 5, p. 832–847.e4, 2017.

NOCUA, P. A. et al. Leishmania braziliensis replication protein A subunit 1: molecular modelling, protein expression and analysis of its affinity for both DNA and RNA. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 573, 2014.

NORDLUND, P.; REICHARD, P. Ribonucleotide Reductases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 681–706, 2006.

OAKLEY, G. G. et al. RPA phosphorylation in mitosis alters DNA binding and protein-protein interactions. **Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 3255–64, 2003.

OAKLEY, G. G.; PATRICK, S. M. Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**,

v. 15, p. 883–900, 2010.

OBADO, S. O. et al. High-Efficiency Isolation of Nuclear Envelope Protein Complexes from Trypanosomes. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. v. 1411, p. 67–80, 2016.

OLSON, E. et al. RPA2 Is a Direct Downstream Target for ATR to Regulate the S-phase Checkpoint. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39517–39533, 2006..

PALM, W.; DE LANGE, T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 301–334, 2008.

PARK, J. S. et al. Zinc finger of replication protein A, a non-DNA binding element, regulates its DNA binding activity through redox. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29075–80, 1999.

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

PAVANI, R. S. **Caracterização da interação RPA-1-telômero em Trypanosoma cruzi**. 2014. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-28112014-132853/>>. Acesso em: 23 dez. 2018.

PAVANI, R. S. et al. RPA-1 from *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1) structurally differs from other eukaryote RPA-1 and interacts with telomeric DNA via its N-terminal OB-fold domain. **FEBS letters**, v. 588, n. 24, p. 4740–8, 2014.

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

PAVANI, R. S. et al. Replication Protein A-1 Has a Preference for the Telomeric G-rich Sequence in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 345–356, 2018.

PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 129, n. 1, p. 79–90, 2003.

PETERMANN, E. et al. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. **Molecular cell**, v. 37, n. 4, p. 492–502, 2010..

PIMENTEL, A. S.; GUIMARÃES, C. R. W.; MILLER, Y. Molecular Modeling: Advancements and Applications. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–2, 2013.

RAMÍREZ, C. A. et al. Identification of proteins interacting with HSP70 mRNAs in *Leishmania braziliensis*. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 124–137, 2013.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

REIS-CUNHA, J. L. et al. Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 499, 2015.

REIS-CUNHA, J. L.; VALDIVIA, H. O.; BARTHOLOMEU, D. C. Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. **Current genomics**, v. 19, n. 2, p. 87–97, 2018.

RICE, C.; SKORDALAKES, E. Structure and function of the telomeric CST complex. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 14, p. 161–7, 2016.

RIDER, S. D. et al. The protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* possesses two functionally and evolutionarily divergent replication protein A large subunits. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31460–9, 2005.

ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2011.

ROUGERON, V.; DE MEEÛS, T.; BAÑULS, A.-L. Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p. 128–132, 2017.

RUBTSOVA, M. P. et al. Replication protein A modulates the activity of human telomerase in vitro. **Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 92–96, 2009.

SAKAGUCHI, K. et al. The multi-replication protein A (RPA) system - a new perspective. **FEBS Journal**, v. 276, n. 4, p. 943–963, 2009.

SALAS, T. R. et al. Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 17, p. 4857–65, 2006.

SALDIVAR, J. C. et al. An intrinsic S/G<sub>2</sub> checkpoint enforced by ATR. **Science**, v. 361, n. 6404, p. 806–810, 2018.

SANTIAGO, A. et al. p53 SUMOylation promotes its nuclear export by facilitating its release from the nuclear export receptor CRM1. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 17, p. 2739–52, 2013.

SCHRAMKE, V. et al. RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. **Nature Genetics**, v. 36, n. 1, p. 46–54, 2004.

SIKORSKI, T. W. et al. Sub1 and RPA associate with RNA polymerase II at different

stages of transcription. **Molecular cell**, v. 44, n. 3, p. 397–409, 2011.

SILVA-DOS-SANTOS, D. et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005507, 2017.

SINGH, A.; XU, Y.-J. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. **Genes**, v. 7, n. 11, 2016.

SMITH, J.; ZOU, H.; ROTHSTEIN, R. Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. **Biochimie**, v. 82, n. 1, p. 71–8, 2000.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–60, 2000.

STANKOVIC-VALENTIN, N. et al. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 7, p. 2661–75, 2007.

STEPHAN, H. et al. Ionizing radiation-dependent and independent phosphorylation of the 32-kDa subunit of replication protein A during mitosis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 18, p. 6028–6041, 2009.

STEVERDING, D. The history of African trypanosomiasis. **Parasites & vectors**, v. 1, n. 1, p. 3, 2008.

STEWART, J. A. et al. Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 17, p. 3537–3549, 2012.

SUROVTSEVA, Y. V. et al. Conserved Telomere Maintenance Component 1 Interacts with STN1 and Maintains Chromosome Ends in Higher Eukaryotes. **Molecular Cell**, v. 36, n. 2, p. 207–218, 2009.

TAKASHI, Y. et al. Arabidopsis Replication Protein A 70a is Required for DNA Damage Response and Telomere Length Homeostasis. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 11, p. 1965–1976, 2009.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749, 2012.

THEOBALD, D. L.; MITTON-FRY, R. M.; WUTTKE, D. S. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, p. 115–33, 2003.

THEOBALD, D. L.; WUTTKE, D. S. Prediction of Multiple Tandem OB-Fold Domains in Telomere End-Binding Proteins Pot1 and Cdc13. **Structure**, v. 12, n. 10, p. 1877–1879, 2004.

THOMAS, H. J. Genetic instability in colorectal cancer. **Gut**, v. 43, n. 4, p. 450–1, 1998.

TOMITA, K. How long does telomerase extend telomeres? Regulation of telomerase release and telomere length homeostasis. **Current Genetics**, v. 64, n. 6, p. 1177–1181, 2018.

TRIANA, O. et al. Trypanosoma cruzi: Variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 62–66, 2006.

TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 644–656, 2017..

TUSZYNSKA, I. et al. NPDock: a web server for protein-nucleic acid docking. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W425-30, 2015.

UNSAL-KACMAZ, K. et al. The Human Tim/Tipin Complex Coordinates an Intra-S Checkpoint Response to UV That Slows Replication Fork Displacement. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3131–3142, 2007.

UPTON, H. E. et al. Shared Subunits of Tetrahymena Telomerase Holoenzyme and Replication Protein A Have Different Functions in Different Cellular Complexes. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 1, p. 217–228, 2017.

VAIDYANATHAN, V. G.; XU, L.; CHO, B. P. Binding kinetics of DNA-protein interaction using surface plasmon resonance. **Protocol Exchange**, 2013.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine-isolated Leishmania (Leishmania) amazonensis from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 7, p. 40804, 2017.

VARGAS, N.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 131–141, 2004.

VASSIN, V. M.; WOLD, M. S.; BOROWIEC, J. A. Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 5, p. 1930–43, 2004.

VOSS, T. S. et al. Plasmodium falciparum Possesses a Cell Cycle-regulated Short Type Replication Protein A Large Subunit Encoded by an Unusual Transcript\* Downloaded from. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17493–17501, 2002.

WAGA, S.; STILLMAN, B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by



reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. **Nature**, v. 369, n. 6477, p. 207–12, 1994.

WALLIKER, D. Genetic recombination in malaria parasites. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 3, p. 303–309, 1989.

WANG, F. et al. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 506–510, 2007.

WANG, J.; LINDAHL, T. Maintenance of Genome Stability. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 14, n. 3, p. 119–121, 2016.

WARD, I. M.; CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47759–62, 2001.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392–400, 2008.

WHO (World Health Organization), (2018). Chagas Disease (American Trypanosomiasis) <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 15 dez 2018

WHO (World Health Organization), (2018). Sleeping Sickness (African Trypanosomiasis) <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))>. Acesso em: 15 dez 2018

WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 125, n. 1–2, p. 211–6, 2002.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-10, 2007.

WOLD, M. S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. **Annual review of biochemistry**, v. 66, p. 61–92, 1997.

WOLD, M. S.; KELLY, T. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 8, p. 2523–7, 1988.

WOOD, L. D. et al. Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 6, p. 3257–62, 2003.

WU, P.; TAKAI, H.; DE LANGE, T. Telomeric 3' Overhangs Derive from Resection by Exo1 and Apollo and Fill-In by POT1b-Associated CST. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 39–52, 2012.

WU, X. et al. Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 3, p. 473–480, 2005.

WU, X.; SHELL, S. M.; ZOU, Y. Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4728–35, 2005.

XU, D. et al. Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. **Molecular biology of the cell**, v. 23, n. 18, p. 3677–93, 2012.

XU, J.; HUANG, L.; LI, J. DNA aneuploidy and breast cancer: a meta-analysis of 141,163 cases. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 60218–60229, 2016.

XU, X. et al. The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 24, p. 7345–53, 2008.

YANG, X. et al. RAP1 Is Essential for Silencing Telomeric Variant Surface Glycoprotein Genes in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 99–109, 2009.

YASUR-LANDAU, D. et al. Resistance of *Leishmania infantum* to allopurinol is associated with chromosome and gene copy number variations including decrease in the S-adenosylmethionine synthetase (METK) gene copy number. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 403–410, 2018.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 101–107, 2009.

YOU, J. S.; WANG, M.; LEE, S. H. Functional characterization of zinc-finger motif in redox regulation of RPA-ssDNA interaction. **Biochemistry**, v. 39, n. 42, p. 12953–8, 2000.

ZEMAN, M. K.; CIMPRICH, K. A. Causes and consequences of replication stress. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 2–9, 2014.

ZHANG, H. et al. RPA Interacts with HIRA and Regulates H3.3 Deposition at Gene Regulatory Elements in Mammalian Cells. **Molecular Cell**, v.65, n.2, p.272-284 , 2017.

ZHAO, M. et al. PCAF/GCN5-Mediated Acetylation of RPA1 Promotes Nucleotide Excision Repair. **Cell Reports**, v. 20, n. 9, p. 1997–2009, 2017.

ZHAO, Q. et al. GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W325–W330,

2014.

ZHENG, D.-Q. et al. Global analysis of genomic instability caused by DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 50, p. E8114–E8121, 2016.

ZHENG, G.; YANG, Y.-C. Sumoylation and Acetylation Play Opposite Roles in the Transactivation of PLAG1 and PLAGL2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40773–40781, 2005.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–4, 2009.

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

ZOU, L.; ELLEDGE, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1542–8, 2003.

ZOU, Y. et al. Functions of human replication protein A (RPA): From DNA replication to DNA damage and stress responses. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, n. 2, p. 267–273, 2006.