

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANA CASTILHOS SOUZA UMAKI

**CARACTERIZAÇÃO DAS TOPOISOMERASES III α E III β DE
*Trypanosoma cruzi***

**CURITIBA
2013**

ADRIANA CASTILHOS SOUZA UMAKI

**CARACTERIZAÇÃO DAS TOPOISOMERASES III α E III β DE
*Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

**Orientadores: Dr. Stenio Perdigão Fragoso
Dr. Marco Aurélio Krieger**

**CURITIBA - PR
SETEMBRO - 2013**

U48 Umaki, Adriana Castilhos Souza
Caracterização das Topoisomerases IIIA E IIIB de
Trypanosoma cruzi / Adriana Castilhos Souza Umaki.
– Curitiba, 2013.
132 f. : il., tabs.

Orientadores : Stenio Perdigão Fragoso e Marco
Aurélio Krieger
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Inclui referências

1. Topoisomerases IIIA E IIIB – Características.
2. DNA topoisomerase I. 3. Trypanosoma cruzi -
Teses. I. Fragoso, Stenio Perdigão. II. Krieger,
Marco Aurélio. III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV.
Título.

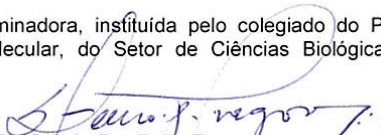
CDD 22.ed. 616.9363

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

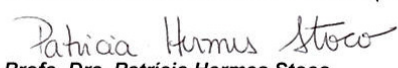
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER


A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoço
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas (ICC)


Profa. Dra. Iriane Eger
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)


Profa. Dra. Patricia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


Prof. Dr. Jorge Iulek
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)


Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

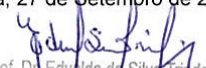
E tendo como suplentes,

Prof. Dr. Alejandro Correa Dominguez
Instituto Carlos Chagas (ICC)

Prof. Dr. Luis Gustavo Morello
Instituto Carlos Chagas (ICC)

Após arguir a candidata **Adriana Castilhos Souza Umaki**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização das DNA topoisomerasas III α e III β do protozoário *Trypanosoma cruzi*", são de parecer favorável à Aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.
A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Setembro de 2013


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

ATA DA TRECENTÉSIMA QUADRAGÉSIMA TERCEIRA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos vinte e sete dias do mês de Setembro de dois mil e treze, às 14h00min, nas dependências do Instituto Carlos Chagas (ICC), reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs: Drs. Iriane Eger (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Patricia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina), Jorge Iulek (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Wanderson Duarte da Rocha (Universidade Federal do Paraná), e Stênio Perdigão Fragoso (Orientador do Instituto Carlos Chagas), com a finalidade de julgar a Tese da candidata **Adriana Castilhos Souza Umaki**, intitulada: "Caracterização das DNA topoisomerasas III α e III β do protozoário *Trypanosoma cruzi*", para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dr. Stênio Perdigão Fragoso. Após analisar a tese e arguida a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela "Aprovada", habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Examinador/Afiliação

Parecer

Assinatura

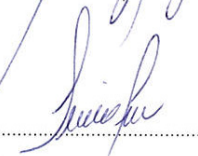
Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas

Aprovada



Profa. Dra. Iriane Eger
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Aprovada



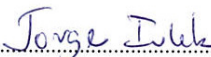
Profa. Dra. Patricia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

APROVADA



Prof. Dr. Jorge Iulek
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Aprovada



Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Aprovada



Aos meus amores, Stenio e Tiago,
pelo apoio, amor, carinho e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Stenio orientador, que me assumiu como aluna já no final do prazo, por me guiar, apoiar, ensinar a fazer pesquisa e a amar o que eu faço. Que me formou como Bióloga Molecular, me ensinando a ter a uma visão crítica e ser o mais correta possível com tudo o que eu faço.

Ao Stenio marido e companheiro, meu amor e porto seguro, que me incentivou nas horas difíceis, que não me deixou desistir, que me deu todo o apoio e estrutura emocional para que eu tivesse tranquilidade para a realização deste trabalho, e assumiu o Tiago integralmente, dias, noites, fins de semana e feriados, para que eu pudesse concluir esta tese, sem nunca hesitar.

Ao Marco Krieger pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio, suporte e confiança.

Aos amigos que me incentivaram a começar e não me deixaram desistir, Alda Maria, Christian Probst e Daniela Pavoni. Sem vocês, este trabalho não existiria.

Aos colaboradores por aceitarem fazer parte deste trabalho, Rafael Kessler, Fernando Yamamoto, Dr. Fabricio Marchini, Dra. Marjorie Mendes Marini e Dr. José Franco da Silveira, suas contribuições foram fundamentais para o enriquecimento deste.

Aos amigos que me ajudaram sem ambições nem pretensões, com carinho e amizade, que valem mais do que qualquer coisa, Daniela Pavoni, Alda Maria, Mônica Alcântara, Fernando Yamamoto, Michel Batista, Mariana Serpeloni e Gisele Picchi.

Ao Lab 2 pela convivência, pelas tantas conversas científicas e não científicas, pelos choros e risos, pelos géis tirados, digestões, recombinações, transfecções e todas as pequenas ajudas do dia a dia, Monica, Fernando, Daniela Fiori, Alda Maria, Flavia, Rosana, Gisele, Vanessa, Felipe e Claudia. Ninguém trabalha sozinho ou isolado, vocês fazem parte deste trabalho.

À Daniela Pavoni, que foi anfitriã, amiga, revisora, avaliadora, e que me ajudou muito nos últimos meses, que foram os mais difíceis.

Ao Michel Batista, por compartilhar as mesmas angústias e pressões através de longas conversas sobre obra, gesso, mudança, pedreiro, marceneiro, tese, pós-graduação, regimento, orientador, prazo, proteômica, imunoprecipitações, orbitrap, análises proteômica, filhos e muitas outras coisas, foi confortante ter alguém no mesmo barco para conversar sobre o turbilhão em que estavam nossas vidas em final de tese.

Ao pessoal do preparo, Nilson Fidêncio, Silvio, Tânia e Cibelli, o trabalho de vocês é a base fundamental para o trabalho de muitas pessoas do ICC.

Às secretárias Marlene, Maria Cristina e Vivielyn pelo suporte.

Ao Prof. Edvaldo, que me apoiou e confiou na execução do trabalho, indicando-me o caminho para que ele pudesse ser realizado.

À minha família pelo apoio, torcida e compreensão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Plante seu jardim e decore sua alma,
ao invés de esperar que alguém lhe traga
flores. E você aprende que realmente pode
suportar, que realmente é forte, e que pode ir
muito mais longe depois de pensar que não
se pode mais.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - CLASSIFICAÇÃO DAS TOPOISOMERASES.....	1
1.2 - TOPOISOMERASES TIPO I.....	2
1.2.1 - TOPOISOMERASES IA.....	3
1.2.2 - TOPOISOMERASES IB.....	5
1.2.3 - TOPOISOMERASE IC.....	5
1.3 – ESTRUTURA DAS TOPOISOMERASES.....	6
1.3.1 - TOPOISOMERASE IA.....	6
1.3.2 - TOPOISOMERASE IB.....	8
1.3.3 - TOPOISOMERASE IC.....	10
1.4 - MECANISMO DE AÇÃO.....	11
1.4.1 - TOPOISOMERASES IA.....	11
1.4.2 - TOPOISOMERASES IB.....	15
1.4.3 - TOPOISOMERASE IC.....	16
1.5 - TOPOISOMERASES DO TIPO II.....	16
1.6 - FUNÇÕES BIOLÓGICAS.....	18
1.7 - INTERAÇÕES COM OUTRAS PROTEÍNAS.....	20
1.8 - TOPOISOMERASES COMO ALVOS ANTIPARASITARIOS.....	22
1.9 - TOPOISOMERASES NO CONTEXTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	24
2 - OBJETIVOS.....	28
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 - REAGENTES.....	28
3.2 - MEIOS DE CULTURA.....	29
3.3 - TAMPÕES E SOLUÇÕES.....	30
3.4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.....	33
3.5 – TÉCNICAS.....	35
3.5.1 - MINIPREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO.....	35
3.5.2 - PREPARAÇÃO DE <i>E. coli</i> CÁLCIO-COMPETENTE.....	35
3.5.3 - TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES.....	36
3.5.4 - SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES.....	37
3.5.4.1 - SELEÇÃO PELA TÉCNICA DA PALITAGEM (TOOTHPICK)	37
3.5.4.2 - PCR DE COLÔNIA.....	37
3.5.5 - PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO FENOL/CLOROFÓRMIO.....	37
3.5.6 - NOCAUTE GÊNICO.....	38
3.5.6.1 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE <i>TcTOPO3α</i>	38
3.5.6.2 – AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE <i>TcTOPO3β</i>	38
3.5.6.3 – CLONAGEM NO VETOR pNEO2.....	39
3.5.6.4 - AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES 5'CDS-NEO-3'CDS.....	39
3.5.6.5 - TRANSFECCÃO DO <i>T. cruzi</i> COM OS CASSETES 5'CDS-NEO-3'CDS..	40
3.5.6.6 - EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>T. cruzi</i>	41
3.5.6.7 - AVALIAÇÃO DA INSERÇÃO DOS CASSETES NO GENOMA DE <i>T. cruzi</i>	42
3.5.6.7.1 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE HIGRO.....	42
3.5.6.7.2 DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS pNEO2 Δ top3 (α E β)	43
3.5.6.8 – CLONAGEM DO GENE HIGRO.....	43

3.5.6.9 - AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES 5'CDS-HYG-3'CDS.....	43
3.5.6.10 - TRANSFEÇÃO DOS CASSETES 5'CDS-HYG-3'CDS.....	43
3.5.6.11 - EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>T. cruzi</i>	44
3.5.6.12 - ANÁLISE DA INSERÇÃO DO CASSETE HIGRO NO GENOMA DE <i>T. cruzi</i>	44
3.5.6.13 - ANÁLISE DA INSERÇÃO DOS GENES NEO E HIGRO NO GENOMA DOS MUTANTES NULOS PARA <i>TOPO3α</i> E <i>TOPO3β</i> POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	45
3.5.6.13.1 – SEPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE <i>T. cruzi</i> POR ELETROFORESE DE PULSOS ALTERNADOS (PFGE)	45
3.5.6.13.1 – <i>SOUTHERN BLOT</i>	46
3.5.7 - CURVA DE CRESCIMENTO DOS MUTANTES.....	47
3.5.8 – ANÁLISE DO CARIÓTIPO DOS MUTANTES NULOS PARA <i>TOPO3α</i> E <i>TOPO3β</i>	47
3.5.9 – EXPOSIÇÃO DOS PARASITAS AOS AGENTES GENOTÓXICOS.....	48
3.5.9.1 – TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA.....	48
3.5.9.2 – TRATAMENTO COM O ANTIBIÓTICO FLEOMICINA.....	48
3.5.10 - CLONAGEM PARA EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	49
3.5.10.1 - PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TcTOPO3 α e TcTOPO3 β	50
3.5.10.2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TcTOPO3 α e TcTOPO3 β ATRAVÉS DA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.....	50
3.5.11 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	51
3.5.12 - IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEICOS UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS.....	52
3.5.12.1 - PREPARO DAS ESFERAS MAGNÉTICAS E INCUBAÇÃO COM O EXTRATO PROTEICO.....	53
3.5.12.2 - PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	53
3.5.12.3. ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	54
3.5.12.4 - ANÁLISE DOS DADOS DE PROTEÔMICA.....	55
3.5.13 – SUPER-EXPRESSÃO DE <i>TcTOPO3α</i> E <i>TcTOPO3β</i> EM <i>T. cruzi</i>	56
3.5.13.1 – AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES <i>TcTOPO3α</i> E <i>TcTOPO3β</i> NO VETOR pNEO3xFlag.....	56
3.5.13.2 – TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i> COM OS PLASMÍDEOS pNEO3xFlag/ <i>TcTOPO3α</i> E pNEO3xFlag/ <i>TcTOPO3β</i>	59
3.5.13.3 – ANÁLISE DA SUPER-EXPRESSÃO DAS TOPOISOMERASES III RECOMBINANTES (TcTOPO3-FLAG) POR <i>WESTERN BLOT</i>	59
3.5.14 – IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEICOS.....	60
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 - NOCAUTE GÊNICO.....	70
4.2 - CURVA DE CRESCIMENTO DOS PARASITAS NOCAUTES <i>topo3α</i>^{-/-} E <i>topo3β</i>^{-/-}.....	80
4.3. - EXPOSIÇÃO DOS PARASITAS AO INIBIDOR DO CICLO CELULAR HIDROXIUREIA.....	82
4.4 - EXPOSIÇÃO DOS PARASITAS AO AGENTE GENOTÓXICO FLEOMICINA	88
4.5 – ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENOMA DOS PARASITAS <i>topo3α</i>^{-/-} E <i>topo3β</i>^{-/-} POR ELETROFORESE DE PULSOS ALTERNADOS (PFGE).....	92
4.6 – IMUNOPRECIPITACAO DE PROTEINAS.....	95
5 - CONCLUSÕES.....	99
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 1</u> - MECANISMOS DE AÇÃO DA TOPOISOMERASES.....	2
<u>FIGURA 2</u> – ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DAS TOPOISOMERASES IA.....	8
<u>FIGURA 3</u> – ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA TOPOISOMERASE IB HUMANA.....	9
<u>FIGURA 4</u> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS DA TOPOISOMERASE V.	10
<u>FIGURA 5</u> – MECANISMO “ENZIMA-PONTE” PROPOSTO PARA TOPOISOMERASES DO TIPO IA.....	12
<u>FIGURA 6</u> – MECANISMO “ROTAÇÃO DA FITA” PROPOSTO PARA TOPOISOMERASES DO TIPO IB.....	15
<u>FIGURA 7</u> - CICLO DE VIDA DE <i>T. cruzi</i>	25
<u>FIGURA 8</u> - DESENHO ESQUEMÁTICO DA LOCALIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA TcTOPO3 α	34
<u>FIGURA 9</u> - DESENHO ESQUEMÁTICO DA LOCALIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA TcTOPO3 β	34
<u>FIGURA 10</u> - ESQUEMA DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DAS CLONAGENS EM pNEO 2.....	39
<u>FIGURA 11</u> - VETOR PARA EXPRESSÃO EM <i>T. cruzi</i> p3XFLAG.....	56
<u>FIGURA 12</u> - MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONRTM221.....	57
<u>FIGURA 13</u> – COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ENTRE AS TOPOISOMERASES III α (Tc_alfa) E III β (Tc_beta) DE <i>T. cruzi</i>	63
<u>FIGURA 14</u> – COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE TOPOISOMERASES IA.....	66
<u>FIGURA 15</u> – COMPARAÇÃO ENTRE AS REGIÕES C-TERMINAL DA TOPOISOMERASE III ALFA DE <i>T. cruzi</i> (TC_3alfa) (AY850132) e topoisomerase I de <i>E. coli</i> (EC_1) (NP_415790.1).....	68
<u>FIGURA 16</u> - COMPARAÇÃO ENTRE AS REGIÕES C-TERMINAL DA TOPOISOMERASE III β de <i>T. cruzi</i> (TC_3beta) (AY850133) E TOPOISOMERASE I DE <i>E. coli</i> (EC_1) (NP_415790.1).....	69
<u>FIGURA 17</u> - ALINHAMENTO ENTRE AS REGIÕES C-TERMINAL DAS TOPOISOMERASES III β	70
<u>FIGURA 18</u> - DIAGRAMA DO PLASMÍDEO pNEO2 Δ top3 UTILIZADO PARA NOCAUTE DOS GENES TOPO3 DE <i>T. cruzi</i>	71
<u>FIGURA 19</u> - ESQUEMA DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DAS CLONAGENS EM pNEO 2.....	71
<u>FIGURA 20</u> - DESENHO ESQUEMÁTICO DEMONSTRANDO O VETOR pNEO2.....	72
<u>FIGURA 21</u> - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES 5`CDS-NEO-3`CDS NAS POPULAÇÕES DOS PARASITAS G418-RESISTENTES.....	74
<u>FIGURA 22</u> - <i>T. cruzi</i> MUTANTE PARA TOPO3 α - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES 5`CDS-NEO-3`CDS E 5`CDS-HIGRO-3`CDS NAS POPULAÇÕES DOS PARASITAS RESISTENTES A G418 E HIGROMICINA.....	76
<u>FIGURA 23</u> - <i>T. cruzi</i> MUTANTE PARA TOPO3 β - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DOS CASSETES 5`CDS-NEO-3`CDS E 5`CDS-HIGRO-3`CDS NAS POPULAÇÕES DOS PARASITAS RESISTENTES A G418 E HIGROMICINA.....	76
<u>FIGURA 24</u> - <i>T. cruzi</i> MUTANTE PARA TOPO3 α - ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE 5`CDS3 α -BLAST-3`CDS3 α NA POPULAÇÃO topo3 β ^{-/-} RESISTENTE A G418, HIGROMICINA E BLASTICIDINA.....	78

<u>FIGURA 25</u> - ENSAIO DE <i>SOUTHERN BLOT</i> A PARTIR DA SEPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE <i>T. cruzi</i> Dm28c SELVAGEM (WT) E MUTANTE <i>topo3α^{-/-}</i> (3 α) POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	79
<u>FIGURA 26</u> - ENSAIO DE <i>SOUTHERN BLOT</i> A PARTIR DA SEPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE <i>T. cruzi</i> Dm28c SELVAGEM (WT) E MUTANTE <i>topo3β^{-/-}</i> (3 β) POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	80
<u>FIGURA 27</u> – CURVA DE CRESCIMENTO <i>T. cruzi</i> Dm28c SELVAGEM (WT) E NOCAUTES <i>topo3α^{-/-}</i> e <i>topo3β^{-/-}</i>	82
<u>FIGURA 28</u> - ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE POPULAÇÕES DE <i>T. cruzi</i> (FORMAS EPIMASTIGOTAS) SINCRONIZADAS POR TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA.....	85
<u>FIGURA 29</u> – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM NA PRESENÇA DE FLEOMICINA.	91
<u>FIGURA 30</u> – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>T. cruzi</i> <i>topo3β^{-/-}</i> NA PRESENÇA DE FLEOMICINA.....	91
<u>FIGURA 31</u> – ENSAIO DE <i>SOUTHERN BLOT</i> UTILIZANDO SONDAS DE REGIÕES REPETITIVAS.....	94
<u>FIGURA 32</u> – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TOPOISOMERASES III RECOMBINANTES EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> POR <i>WESTERN BLOT</i> , USANDO O ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA A ETIQUETA FLAG....	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: TABELA CONTENDO AS PROTEÍNAS REFERENTES AOS PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS NA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TOPO3 α	93
TABELA 2: TABELA CONTENDO AS PROTEÍNAS REFERENTES AOS PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS NA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TOPO3 β	93

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AS AMPLIFICAÇÕES E CLONAGENS.....	33
QUADRO 2 – SONDAS RADIOATIVAS.....	47
QUADRO 3: PARÂMETROS SELECIONADOS NO ALGORÍTMO MAXQUANT.....	55
QUADRO 4: TAMANHO DOS FRAGMENTOS CLONADOS PARA A GERAÇÃO DOS NOCAUTES.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

DNA : ácido desoxirribonucléico

Dm: *Didelphis marsupialis*

dNTP: desoxiribonucleotídeos trifosfato

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

g: aceleração da gravidade

HCl: ácido clorídrico

HU: Hidroxiuréia

IFI: imunofluorescência indireta

IPTG: *isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside*

kb: quilobase

kDa: quiloDalton

KCl: cloreto de potássio

kDNA: DNA do cinetoplasto

LB: meio de cultura Luria-Bertani

LIT: meio de infusão de fígado e triptose (*liver infusion triptose*)

M: molar

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

NBT: nitro blue tetrazolium chloride

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NaCl: cloreto de sódio

ng: nanograma

nm: nanômetro

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia pela polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNAm: RNA mensageiro

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

SSC: tampão citrato-salino

Tris: hidroximetil aminoetano

Tween-20: monolaurato de polioxietileno 20 sorbitana

V: Volts

μg : micrograma

μL : microlitro

μm : micrômetro

μM : micromolar

%: porcentagem

$^{\circ}\text{C}$: graus Célsius

RESUMO

DNA topoisomerasas catalizam a interconversão de isômeros topológicos de DNA e são necessárias para a resolução de estresse torcional no DNA e para a liberação de moléculas concatenadas. DNA topoisomerase III pertence à subfamília IA das topoisomerasas que catalizam a remoção de superenovelamentos negativos através da clivagem de DNA simples fita. As topoisomerasas III participam de processos celulares como replicação, recombinação homóloga e reparo de DNA e são importantes para a manutenção da integridade do genoma. Neste trabalho nós investigamos as topoisomerasas III de *Trypanosoma cruzi* (TcTOPO3 α e TcTOPO3 β).

Para avaliar a função de TcTOPO3, nós inativamos sequencialmente ambos os alelos de cada um dos genes substituindo-os por cassetes contendo marcadores de seleção (neo ou Hgro) através de recombinação homóloga. Nós observamos que mutantes para ambos os genes TcTOPO3 são viáveis, entretanto o mutante *Tctopo3 α* exibe dificuldade no crescimento, enquanto o mutante Tc $topo3\beta$ cresce de forma similar aos parasitas selvagens, sugerindo as enzimas TOPO3 possuem diferentes funções na célula e que uma enzima não pode substituir a outra em suas funções. Com a finalidade de avaliar a resposta à danos celulares em mutantes TOPO3 de *T. cruzi* submetemos os parasitas ao inibidor de replicação hidroximetiluracil (HU). Nossas análises por citometria de fluxo mostraram que mutantes Tc $topo3$ são capazes de progredir no ciclo celular inclusive após exposição a altas doses de HU (30 mM), enquanto os parasitas selvagens permaneceram estagnados na fase G₁, sugerindo que ambas as TOPO3 são necessárias para a resposta do DNA à danos e o bloqueio da replicação, provavelmente agindo nos pontos de verificação da fase G₁/S. O mutante *Tctopo3 β* foi tratado com a fleomicina (um agente que induz a quebra da dupla fita) e mostrou uma menor sensibilidade a fleomicina comparado com os parasitas selvagens. Novamente esse resultado nos indica que TOPO3 β provavelmente está envolvida com sinalização de danos no DNA. Nós questionamos também se os mutantes *Tctopo3* produzem um fenótipo de hiperrecombinação, uma vez que pelo menos 50% do genoma de *T. cruzi* é representado por um grande número de elementos repetitivos e membros de famílias multigênicas. Para as análises utilizou-se eletroforese de campo pulsado e sondas radioativas de DNA satélite e genes de regiões subteloméricas de *T. cruzi*, os resultados demonstraram que pelo menos para as sondas utilizadas não houve alterações significativas no cariótipo dos mutantes *Tctopo3* quando comparado com os parasitas selvagens.

Topoisomerase III α eucariótica foi relatada estando associada com duas outras proteínas SGS1 e RMI1/2, em um complexo chamado RTM (RecQ-family helicase, Topoisomerase III α , e RMI1/2). O complexo RTR garante a integridade genômica influenciando em vários aspectos incluindo a replicação do DNA, recombinação meiótica e mitótica e a dinâmica dos telômeros. Uma das maiores funções do complexo RTR é a remoção de intermediários de recombinação que podem ser acumulados durante esses processos. Nós nos perguntamos então se as enzimas TOPO3 de *T. cruzi* estão associadas com o reparo do DNA ou proteínas de checagem do ciclo celular. Para tanto, TcTOPO3 (α e β) contendo uma etiqueta FLAG foram expressas ectopicamente em formas epimastigotas de *T. cruzi*. As proteínas TOPO3-FLAG foram imunoprecipitadas usando um anticorpo monoclonal anti-FLAG seguido de análises em espectrometria de

massas para a identificação de proteínas associadas. Foram identificadas várias proteínas envolvidas em vias metabólicas citoplasmáticas e mitocondriais sem relação aparente com sinalização de danos ao DNA ou atividades celulares específicas. Entretanto, complexos contendo as enzimas TcTOPO3 devem ser dinâmicos e encontrados em pequenas quantidades dentro da célula, fato que explicaria dificuldade na caracterização de proteínas parceiras associadas a elas.

ABSTRACT

DNA topoisomerases catalyze the interconversion of topological isomers of DNA and are required for the resolution of torsional stress in DNA and for the unlinking of topologically intertwined molecules. DNA topoisomerase III belongs to the type IA subfamily of topoisomerases, which catalyze the removal of negative DNA supercoils by cleaving single-strand DNA. Topoisomerases III play roles in cellular processes, such as replication, homologous recombination and DNA repair. These enzymes are important for the maintenance of genome integrity. In this study, we investigated the topoisomerases III from *Trypanosoma cruzi* (TcTOPO α and TcTOPO β). To explore the role of TcTOPO3, we sequentially inactivated both alleles of each gene by placing cassettes containing selectable markers (neo or higo resistance genes) into the middle of TcTOPO3 genes through homologous recombination. Viable mutants for both *TcTOPO3* genes were obtained, however we observed that *Tctopo3 α* mutant displays growth defects, whereas the growth of *Tctopo3 β* mutant was similar to the wild-type cells, suggesting that each TOPO3 enzyme plays distinct roles into the cell and one enzyme could not replace the other in its functions. We therefore investigated whether *T. cruzi* TOPO3 enzymes are important to cell cycle progression, by assessing the response of the null *topo3* mutants to the replication inhibitor hidroxyurea (HU). Flow cytometry analyses show that HU-treated *tctopo3* mutants are able to progress into the cell cycle even with high doses of HU (30 mM), whereas wild-type cells are stalled in G1 phase. This result suggests that both TOPO3 are required for the response to DNA damage and replication block, probably acting in G₁/S checkpoint. *Topo3 β* mutant was also treated with the double strand break (DSB)-inducing agent phleomycin and shows less sensitivity to phleomycin than the wild-type cells. Again, this result indicates that TOPO3 β might be involved in the signaling DNA damage. We asked whether *Tctopo3* mutants display a hyperecombination phenotype as well, as at least 50% of *T. cruzi* genome is represented by large number of repetitive elements and members of multigenic families. *Tctop3* chromosomes were separated by pulsed-field electrophoresis and hybridized with radioactive probes of satellite DNA and genes from subtelomeric regions of *T. cruzi*. Our result showed that at least for the probes used no significant changes in the *Tctop3* karyotype was observed as compared with the wild-type parasites.

Eukaryotic topoisomerase III α is found associated with two other proteins, SGS1 and RMI1/2, in a complex called RTR (R**ec**Q-family helicase a **T**opoisomerase III α , and **R**MI1/2). The RTR complex safeguards genome integrity by influencing various aspects, including DNA replication, mitotic and meiotic recombination, and telomere dynamics. One of major functions of the RTR complex is to remove recombination intermediates that may accumulate

during these processes. Thus, we asked whether *T. cruzi* TOPO3 enzymes are associated with DNA repair or cell cycle checkpoint proteins. TcTOPO3 (α and β) enzymes were ectopically expressed in *T. cruzi* epimastigote forms as FLAG epitope-tagged proteins. TOPO3-FLAG proteins were immunoprecipitated using a monoclonal anti-FLAG epitope followed by mass spectrometry analysis to identify the individual components. As expected, both TOPO3-FLAG proteins were present in the pool of proteins that were immunoprecipitated, many of which are involved in cytoplasm or mitochondrial metabolic pathways with have no apparent correlation with DNA damage signaling or cell cycle activities. However, complexes with TcTOPO3 enzymes might be dynamic and found in low quantities into a cell which may explain the lack of the already well characterized proteins partners associated to them.

1. INTRODUÇÃO

Processos celulares, tais como replicação, transcrição e recombinação requerem o desenovelamento da dupla fita do DNA, a fim de que os cromossomos sejam duplicados ou a informação gênica seja acessada e decodificada. Esse desenovelamento resulta em um estresse torcional que é resolvido com o auxílio das DNA topoisomerasas, uma ampla família de enzimas que mantém a integridade do DNA modificando seu estado topológico (CHAMPOUX, 2001; WANG, 2002; FORTERRE, 2007; SCHOEFFLER e BERGER, 2008; YANG, 2010).

Os diversos estudos realizados sobre as topoisomerasas, desde a época em que duas importantes topoisomerasas foram descobertas em *Escherichia coli*, ainda na década de 70, quais sejam a topoisomerase I (WANG, 1971) e a topoisomerase II (GELLERT *et al.*, 1976), mostram a importância dessas enzimas nos processos celulares que envolvem a manipulação das fitas do DNA e, conseqüentemente, na própria sobrevivência da célula. Em virtude disso, as topoisomerasas são alvos bastante atrativos para o desenvolvimento de drogas, capazes de inibir especificamente sua função tanto em células neoplásicas como em patógenos causadores de doenças de interesse médico e veterinário.

1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS TOPOISOMERASES

Existem diferentes topoisomerasas (topos) que atuam de variadas formas em todos os seres vivos (Figura 1). Essas enzimas são classificadas em dois tipos (I e II) de acordo com o número de fitas que clivam. As topoisomerasas do tipo I clivam apenas uma das fitas do DNA e não necessitam de ATP para as suas atividades. Dentro deste grupo estão as topoisomerasas I e as topoisomerasas III. As topoisomerasas do tipo II, por sua vez, atuam clivando ambas as fitas do DNA. Todas as topoisomerasas do tipo II requerem ATP para sua atividade. Neste grupo estão as enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV e as topoisomerasas II eucarióticas (CHAMPOUX, 2001, CORBETT & BERGER, 2004). A nomenclatura das topoisomerasas foi designada de acordo com a descoberta de cada uma. Em *E. coli* foram descritas (Topo I, III, IV), em eucariotos (Topo I, II, III) e em Archaea (topo V e VI) (WANG,

2005; FORTERRE *et al.*, 2007). Ainda por essa nomenclatura, as topoisomerase do tipo I, com exceção da girase reversa, usam números ímpares em sua nomenclatura, enquanto que a família das topoisomerases do tipo II usam números pares, como as subfamílias topo II, IV, VI, com exceção também da DNA girase.

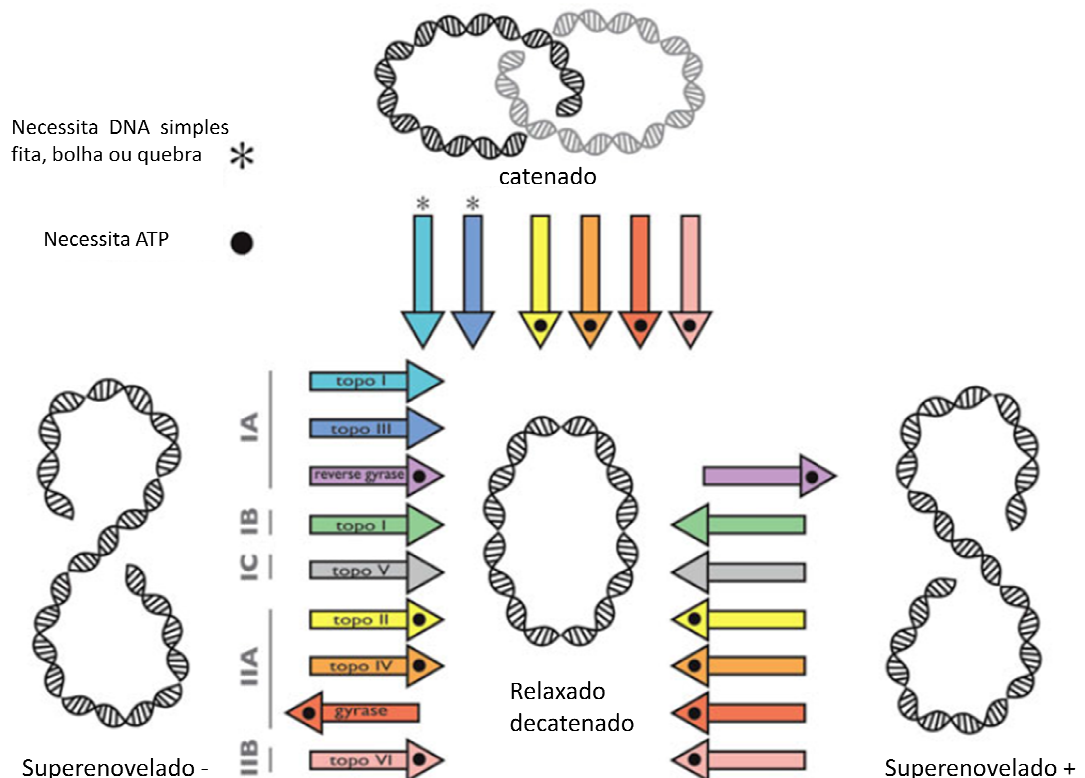


FIGURA 1 - Mecanismos de ação das topoisomerases: DNA topoisomerases possuem funções opostas e que se sobrepõem para a manutenção da topologia do DNA celular. As setas demonstram as diferentes funções de cada enzima sendo concatenação, decatenação, superenovelamento positivo ou negativo. São indicadas a necessidade de ATP, a presença de simples fita, região despereada ou corte em uma das fitas do DNA (Adaptado de SCHOEFLER & BERGER, 2008).

1.2 TOPOISOMERASES TIPO I

Uma característica de todas as topoisomerases do tipo I é o fato de que essas enzimas não necessitam de cofatores energéticos (ATP ou NAD) para suas atividades, com exceção da girase reversa, uma topo I que utiliza a energia da hidrólise do ATP para introduzir superhélices positivas no DNA. Entretanto, as topoisomerases do tipo I exibem diferenças quanto à necessidade de íons e conformação do DNA.

Além da habilidade de relaxar moléculas de DNA superenoveladas, as topoisomerases do tipo I são capazes de catalisar: (a) a formação de laços (*knots*) e a resolução destes (*unknots*) e (b) a concatenação e decatenação de DNA circulares de fita dupla, desde que uma das moléculas contenha um corte em uma das fitas (revisito por WANG, 1996; CHAMPOUX, 2001).

As topoisomerases do tipo I são classificadas em duas sub-famílias: IA e IB. Enzimas da sub-família IA ligam-se, através de um resíduo de tirosina conservado, à extremidade 5' do corte gerado em uma das fitas do DNA e promovem a passagem da fita intacta através da fita clivada. As topoisomerases da sub-família IB, por outro lado, ligam-se à extremidade 3' do corte da fita e deixam a extremidade clivada livre para a rotação ao redor da fita intacta. Membros de cada sub-família possuem similaridades estruturais e de sequências entre si (BELOVA *et al.*, 2001).

As outras divisões das sub-famílias se baseiam na estrutura (DEKKER, 2002; CHAMPOUX, 2001). Geralmente as enzimas topo IA e IB são monoméricas e contem um único domínio. São exceções a girase reversa, a qual possui um domínio de topoisomerase ligado a outro domínio com características de helicase (CHAMPOUX, 2001), e as topoisomerases IB de tripanossomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (UMAKI, 2005), *Trypanosoma brucei* (BODLEY *et al.*, 2003) e *Leishmania donovani* (DAS *et al.*, 2004) que possuem duas subunidades.

1.2.1 TOPOISOMERASES IA

Topoisomerases IA foram descritas pela primeira vez em *E. coli* como proteína ω (WANG, 1971). Desde então, membros dessa família de enzimas vêm sendo descobertos e caracterizados nos três domínios da vida (bactéria, archaea e eucariotos) (CHAMPOUX, 2002, FORTERRE *et al.*, 2007, CHEN *et al.*, 2013).

As topoisomerases IA possuem algumas características peculiares à família. Após a clivagem do DNA, essa classe de enzimas liga-se covalentemente à porção 5'-fosfato do corte realizado na fita do DNA, através de um resíduo de tirosina localizado no sítio ativo. Todas necessitam de íons Mg^{+2} para a atividade de relaxamento. Moléculas de DNA superenovelados

negativamente são substratos para as topo IA, porém, essas enzimas não são capazes de relaxar completamente o DNA.

Quanto menor for o grau de superenovelamento negativo do DNA, mais difícil será para a enzima se ligar ao DNA e, conseqüentemente, sua habilidade de clivagem diminui durante o curso da reação. Já uma molécula de DNA superenovelada positivamente é refratária à ação da enzima tipo IA, a menos que uma região simples fita esteja presente no local (WANG, 1996; CHAMPOUX, 2001).

Fazem parte dessa família as topoisomerases I e III de arqueas e bactérias e as topoisomerases III de eucariotos. Outro membro da família, a girase reversa, está presente em bactérias e arqueas hipertermofílicas (RIOU *et al.*, 1983; CHAMPOUX, 2002; WANG, 2002; KIM & CROSS, 2010; CHEN *et al.*, 2013.).

A topoisomerase I de *E. coli* (WANG, 1971) é o protótipo das topoisomerases do tipo IA. Essa enzima (97 kDa) é codificada pelo gene *topA* e catalisa o relaxamento de DNA superenovelado negativamente. A topo I de *E. coli*, juntamente com a DNA girase (topo II), que introduz superenovelamento negativo nas moléculas de DNA circulares, são responsáveis pela manutenção do grau de superenovelamento do DNA bacteriano, quando ocorre sua alteração pelos processos de replicação, transcrição e recombinação (WANG, 1996a; DRLICA, 1992). Outra importante função da topo I é o relaxamento do DNA superenovelado negativamente gerado pela passagem da RNA polimerase na dupla fita (DROLETS *et al.*, 1994).

As topoisomerases III, que também são enzimas da classe IA, foram identificadas inicialmente em *E. coli* (SRIVENUGOPAL *et al.*, 1984) e em *S. cerevisiae* (WALLIS *et al.*, 1989). A topoisomerase III de *E. coli* é constituída de um único polipeptídeo com peso molecular de 74 kDa (gene *topB*) e difere da topoisomerase I já descrita pela necessidade de K^+ além de Mg^{+2} . Além disso, essa enzima é muito mais efetiva na decatenação de moléculas circulares de DNA do que a própria topoisomerase I, o que sugere que possa participar na decatenação dos cromossomos, após a abertura da dupla fita pela helicase, assim como da replicação (LI & WANG, 1998; WANG, 2002; SEKI *et al.*, 2006).

1.2.2 TOPOISOMERASES IB

Diferente das topoisomerasas IA que estão presentes em todos os organismos, as topoisomerasas do tipo IB compreendem as topoisomerasas I eucarióticas, as de vírus animais e as de algumas poucas bactérias, mas não foram encontradas em arqueas (CHEN *et al.*, 2013).

Topoisomerasas IB diferem significativamente das topoisomerasas IA. Elas não requerem íons metálicos, nem a exposição de um segmento de fita simples de DNA. Além disso, formam um intermediário covalente com a extremidade 3' fosfato do corte na da fita do DNA, são capazes de relaxar tanto super-hélices positivas quanto negativas e realizam o relaxamento total da dupla fita. Essas enzimas não compartilham similaridades estruturais ou de sequência com as topoisomerasas IA (CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996). Essa classe de enzimas foi primeiramente identificada em células embrionárias de camundongos por Champoux e Dubellco em 1972. Posteriormente topois IB foram isoladas de diversos organismos, incluindo levedura (DURNFORD & CHAMPOUX, 1978), timo de bezerro (LAZARUS *et al.*, 1987), *Drosophila melanogaster* (HSIEH & BRUTLAG, 1980), linhagens celulares humanas e animais (LIU, 1983) e diversos protozoários como *T. cruzi* (RIOU *et al.*, 1983), *Trypanosoma brucei* (BAKSI *et al.*, 2004), *Trypanosoma congolense* (DELESPAUX, GEYSEN & GEERTS, 2007) *Leishmania major* (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 2008) e também *Plasmodium falciparum* (ROY *et al.*, 2011).

1.2.3 TOPOISOMERASE IC

O único membro da família, a topoisomerase V, foi até hoje descrito apenas em *Methanopyrus kandleri*, uma arquea presente em respiradouros no fundo do mar no Golfo da Califórnia e que vive sob altas temperaturas que variam entre 100-110°C (SLESAREV *et al.*, 1993). Essa topo V, que havia primeiramente sido classificada como topo IB por Slesarev e cols. (1993), foi posteriormente classificada como topo IC por Forterre e cols. (2007). Entretanto, foi verificado por Belova e cols. (2001) que essa enzima possui também atividade de reparo através de um sítio associado (A/P)apurínico/apirimidínico. Para isso, a proteína encaixa o sulco maior da molécula de DNA no sítio AP que remove o nucleotídeo que posteriormente será reparado por uma polimerase.

Sua temperatura ótima para o relaxamento do DNA varia de 70 a 90°C. Uma hipótese sugerida por Pourquier e cols. (1997) é que o DNA submetido a altas temperaturas fica mais suscetível a lesões apurínicas. Essas lesões que seriam reconhecidas pela topoisomerase V, resultariam na formação de uma ligação proteína-DNA próxima a esse sítio, seguida da ação da topoisomerase conforme descrito anteriormente. Dessa forma, a junção dos dois domínios na mesma enzima auxiliaria na sobrevivência da célula, facilitando o processo de reparo do DNA em altas temperaturas. É sabido que essas lesões aumentam a taxa de ligação topoisomerase/DNA próximas a esses sítios.

1.3. ESTRUTURA DAS TOPOISOMERASES

1.3.1 TOPOISOMERASE 1A

Topoisomerasas IA são todas monoméricas (CHAMPOUX, 2001), possuem um domínio N-terminal de aproximadamente 70 kDa que contém um resíduo de tirosina conservada no sítio ativo, são capazes de clivar DNA simples fita, mas não conseguem relaxar DNA superenovelado positivamente. O domínio C-terminal está envolvido na ligação ao DNA e é bastante divergente. Contudo, esse domínio possui três repetições de tetracisteínas que são críticas para a atividade enzimática e acredita-se que elas constituam o domínio de ligação ao íon zinco. O domínio C-terminal contém também uma região de aproximadamente 14 kDa que se liga ao DNA simples fita e contribui para a processividade da enzima (BERGER, *et al.*, 1998).

A DNA topoisomerase I de *E. coli* possui um domínio de ligação ao DNA na região C-terminal muito maior do que é necessário para sua atividade completa (ZUMSTEIN & WANG, 1986). Essa diferença provavelmente é refletida no tamanho da região do DNA que interage com a proteína: topoisomerase I interage com aproximadamente 40 bases, enquanto topoisomerase III interage com uma região de apenas 14 bases. A grande similaridade entre as sequências dessas topoisomerasas sugere que as reações de clivagem e religação do DNA acontecem da mesma forma nas duas proteínas (MONDRAGÓN & DiGATE, 1999).

A girase reversa é a única topoisomerase que contém um domínio de helicase fusionado à região N-terminal da proteína (BACKER *et al.*, 2009). As topoisomerases III eucarióticas possuem tamanhos similares àqueles da topoisomerase I de *E. coli* e parecem apresentar os domínios conservados em relação a topoisomerase I bacteriana, incluindo domínios de ligação ao zinco. Quando comparadas as duas isoformas de topo III, observou-se que a maior diferença entre topo III α e topo III β está na região C-terminal. Chen e cols. (2012) avaliaram o efeito de diferentes mutações para a topo III α em *Drosophila* e verificaram que a atividade de relaxamento não é alterada na ausência da região C-terminal. Entretanto, essa região é essencial para a dissolução de junção Holliday (a estrutura foi nomeada em referência a Robin Holliday, que a propôs em 1964 para descrever um tipo particular de troca de informação genética em leveduras, conhecida como recombinação homóloga), que foi drasticamente reduzida na ausência dessa região (CHEN *et al.*, 2012).

A região N-terminal da topo III α de humanos contém dois códons de iniciação. A proteína expressa a partir do primeiro códon contém uma sequência sinal para o direcionamento para a mitocôndria. Quando expressa a partir do segundo sinal, é direcionada para o núcleo. Camundongo, *Drosophila* e *S. pombe* também possuem essa sequência sinal para importação para mitocôndria (WANG, LYU & WANG, 2002).

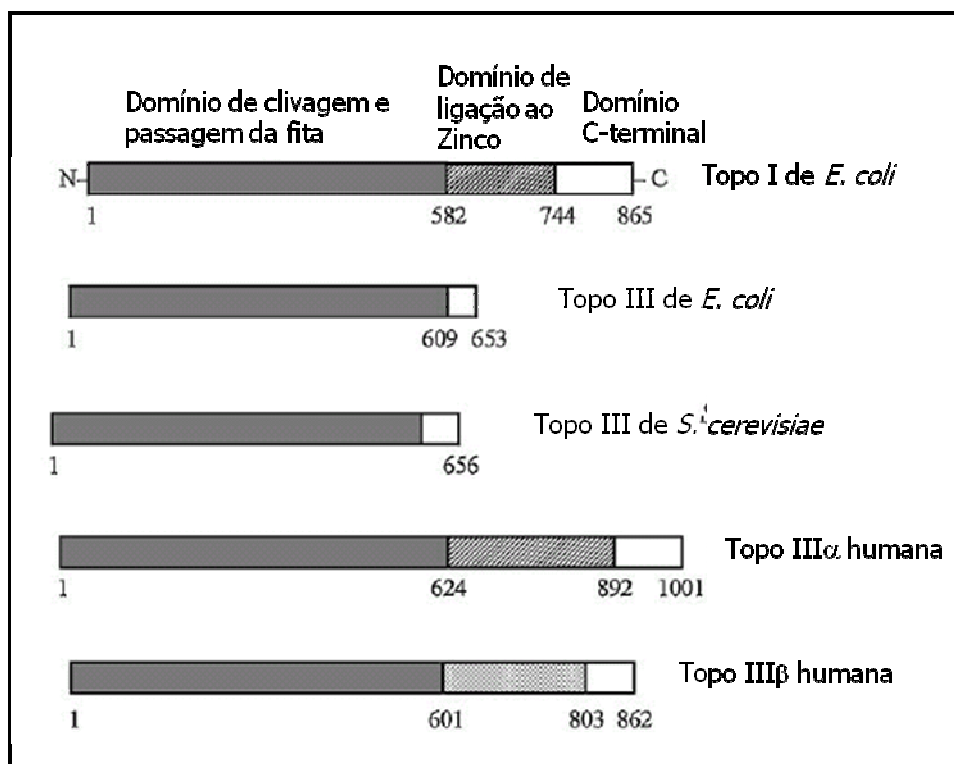


FIGURA 2 – Estrutura dos domínios das topoisomerases IA.

(Fonte: CHAMPOUX, 2001).

1.3.2 TOPOISOMERASE IB

A topoisomerase IB humana possui 91 kDa, enquanto as topoisomerases da mesma família em vírus e bactérias possui aproximadamente 36 kDa. Embora possuam tamanhos diferentes, se assemelham estruturalmente e no mecanismo de ação (BACKER *et al.*, 2009).

A região N-terminal da enzima humana, composta por de 214 aminoácidos, não é necessária para a atividade de relaxamento *in vitro* e forma uma região hidrofílica não estruturada, altamente sensível a ação de proteases. Na região amino-terminal existem quatro sinais para localização nuclear e sítios para interação com outras proteínas como, por exemplo, nucleolinas, antígeno-T do vírus SV40, alguns fatores de transcrição, p53 e proteína WRN (CHAMPOUX, 2001). MO e cols. (2000) demonstraram que apenas uma dessas sequências de sinalização (aminoácidos 150 a 156) é suficiente para o transporte da proteína em direção ao núcleo e que existe uma região (aminoácidos 157 a 199) responsável pelo envio da proteína para o nucléolo. Além disso, os autores identificaram na sequência, uma região de sinalização para o núcleo que é rica

em aminoácidos ácidos, ao contrário das outras quatro descritas, que são ricas em aminoácidos básicos.

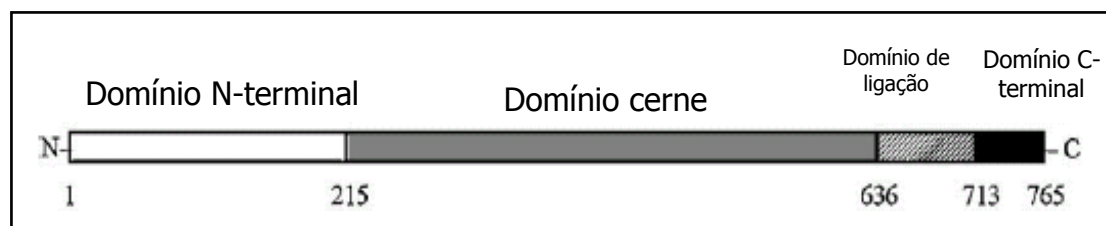


FIGURA 3 – Estrutura dos domínios da topoisomerase IB humana
(Fonte: CHAMPOUX, 2001).

O domínio N-terminal da topoisomerase I humana é seguido por um cerne altamente conservado entre as topoisomerasas I eucarióticas, que contém todos os resíduos catalíticos exceto a tirosina do sítio ativo. Após o cerne há um domínio de 77 aminoácidos sensível a proteases e muito pouco conservado, chamado de domínio de ligação (*linker*), porque une o domínio de 53 aminoácidos, que contém a tirosina conservada do sítio ativo, localizado no C-terminal da proteína, ao domínio cerne. Ao redor da tirosina conservada localizam-se cinco resíduos altamente conservados (Tyr, Arg, Arg, Lys, e His/Asn) que formam uma arquitetura idêntica ao redor do sítio ativo. Pode-se obter uma forma ativa da enzima sem a necessidade da presença do domínio de ligação (STEWART *et al.*, 1996; CHAMPOUX, 2001, BACKER *et al.*, 2009).

Análise por cristalografia de raios X mostra que a topoisomerase I humana tem uma estrutura constituída de dois lóbulos que se posicionam como um grampo colocado transversalmente sobre o eixo da dupla hélice de DNA, abraçando firmemente a molécula (REDINBO *et al.*, 1998). Os dois lóbulos são ligados por uma região “*coiled-coil*” da proteína (domínio de ligação). Quando abraçam o DNA, os lóbulos fazem contato entre si apenas por pontes salinas.

A topoisomerase I do vírus vaccinia (314 aminoácidos) também teve sua estrutura tridimensional resolvida. Análises de dois fragmentos que também tiveram sua estrutura tridimensional resolvidos por cristalografia mostraram que a estrutura do domínio catalítico (região C-terminal) é muito similar à mesma região da topoisomerase I humana e tirosina-recombinases (CHENG *et al.*, 1998). Uma característica comum entre as topoisomerasas do tipo IB e as

proteínas tirosina-recombinases é a presença de um sítio ativo que consiste de dois resíduos de arginina, um de histidina e o resíduo de tirosina que se liga ao DNA (CHAMPOUX, 2001; ESPOSITO & SCOCCA, 1997). Quando as estruturas tridimensionais da enzima do vírus vaccinia e da enzima humana são sobrepostas, elas demonstram grande similaridade na localização dos resíduos catalíticos, exceto em relação à tirosina conservada (REDIMBO, CHAMPOUX, HOL, 1999).

1.3.3 TOPOISOMERASE IC

A topoisomerase V de *M. kandleri* possui 112 kDa divididos em duas partes, a região amino-terminal de 68 kDa onde está localizado o domínio de topoisomerase contendo a tirosina conservada na posição 226, responsável pelo sítio ativo, e o restante da molécula que é constituído por 24 motivos hélice-grampo-hélice (HhH). Esses motivos (HhH) se dispõem em tandem organizados em duas vezes doze motivos e promovem a ligação ao DNA, sendo ricos em lisina e arginina na região carbóxi-terminal, onde se localiza o sítio de processamentoapurínico/apirimidínico (A/P) normalmente associado com excisão de bases e reparo (BELOVA *et al.*, 2001; BELOVA *et al.*, 2002) (FIGURA 4).

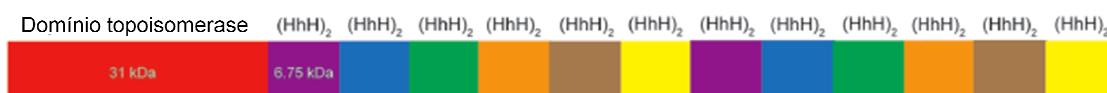


FIGURA 4. Representação esquemática dos domínios da topoisomerase V. Fonte: RAJAN *et al.*, 2013

Em termos de sequência aminoacídica, essa topoisomerase possui similaridade com as topoisomereses IB, fato este que levou à primeira descrição por Slesarev e cols. (1993) como sendo uma topoisomerase IB.

Taneja e cols. (2006) fizeram um estudo comparativo entre os aminoácidos ao redor do sítio ativo de topoisomerases IB de vírus vaccinia e humanos a fim de avaliar suas relações com o sítio ativo e avaliaram também a atividade topoisomerase V de *M. kandleri*. Os autores verificaram que a topo V

realiza a ligação fosfo-tirosina com o DNA e possui atividade de desenovelamento, a enzima também possui alguns aminoácidos conservados similares aos de topoisomerase IB que são importantes na ação catalítica. Entretanto, a topo V possui uma diferença de localização destes aminoácidos, de forma a alterar a estrutura tridimensional proteica, tornando-se diferente das topoisomerases IB. Estudos mutagênicos estruturais mostraram que topoisomerase V não possui o mesmo mecanismo de clivagem e religação conservado entre topoisomerases IB. Foi verificado por Taneja e cols. (2006) que a enzima não possui o domínio característico de topo IB responsável pela acomodação da fita de DNA para a passagem da fita, sugerindo um mecanismo de rotação passo a passo, realizado pela topo IA.

Recentemente Rajan e cols. (2013) sugeriram que a topo V é provavelmente uma enzima de reparo, que recebeu um domínio de topoisomerase para uma atividade mais efetiva no habitat extremo em que vive a arquea *M. kandleri*. Os autores a classificaram como uma AP endonuclease Classe I.

1.4. MECANISMO DE AÇÃO

1.4.1 - TOPOISOMERASES IA

O mecanismo de ação das topoisomerases do tipo IA é baseado em ensaios experimentais com a topoisomerase I de *E. coli*. A cristalografia do fragmento de 67 kDa da topoisomerase I de *E. coli*, que contém o domínio de clivagem e religação do DNA (LIMA *et al.*, 1994), bem como os experimentos de interação entre esse domínio de transesterificação com aquele de ligação ao DNA, possibilitaram grande avanço no entendimento do mecanismo de ação dessa enzima. O modelo de relaxamento do superenovelamento negativo de DNA pela topoisomerase I se baseia na passagem de um segmento de fita simples intacta através de um orifício na estrutura da proteína, dentro do seu domínio de transesterificação N-terminal (CHAMPOUX, 2002).

O domínio de 67 kDa da topoisomerase I de *E. coli* tem a forma de um anel, com uma cavidade grande o suficiente para acomodar um segmento de

DNA dupla-fita, porém, há necessidade de haver mudança conformacional da proteína e DNA de maneira coordenada para que ocorra a passagem da fita intacta do DNA após a sua clivagem (LIMA *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2001; BAKER *et al.*, 2009). Uma vez que esse fragmento é incapaz de relaxar DNA superenovelados negativamente, é possível que os motivos de ligação ao zinco, por interagirem com o DNA, sejam responsáveis por guiar a fita simples não clivada do DNA durante o seu transporte para o interior da cavidade, levando desse modo ao relaxamento do DNA (AHUMADA & TSE-DINH, 2002).

Esse modelo pressupõe a formação de um intermediário enzima-DNA, onde a enzima está covalentemente ligada a extremidade 5' do corte na fita de DNA, ao mesmo tempo em que interage de modo não covalente com a outra extremidade do corte (extremidade 3'), formando uma ponte através da qual a fita complementar não clivada é transportada (*enzyme-bridging strand-passage mechanism*). Dessa maneira, a remoção de superenovelamento negativo do DNA pela topoisomerase I bacteriana se daria nas seguintes etapas (FIGURA 5): 1) ligação da enzima a uma região despareada do DNA duplex; 2) clivagem da fita simples do DNA, com preferência para a presença de um resíduo de citosina na posição -4 para formar o intermediário covalente, 3) mudança conformacional do complexo enzima-DNA, resultando na separação física entre a extremidade contendo o fosfato 5' ligado ao resíduo de tirosina do sítio ativo e a extremidade 3'-OH da fita clivada; 4) passagem da fita complementar através do corte, para o interior do domínio de transesterificação; 5) mudança conformacional para aproximar novamente as extremidades 5'-fosforil e 3'-hidroxil da fita clivada e 6) formação da ligação fosfodiéster (revisto por DEKKER e cols, 2002).

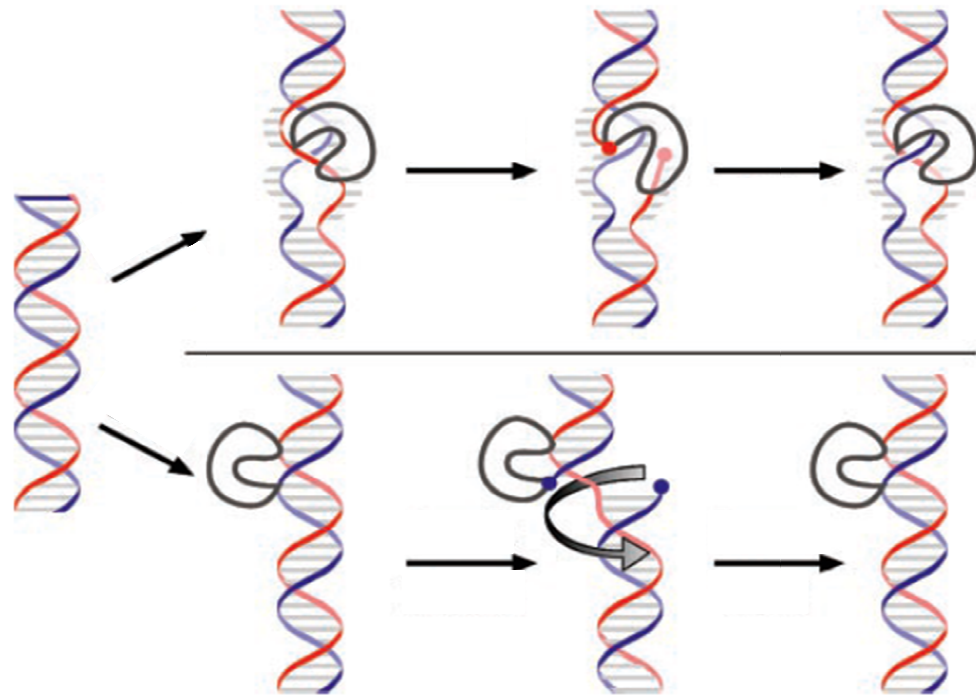


FIGURA 5 – Mecanismo “enzima-ponte” proposto para topoisomerases do tipo IA (linha superior) e mecanismo “rotação de fita” proposto para topoisomerases do tipo IB (linha inferior). No mecanismo utilizado pelas enzimas do tipo IA, uma das fitas é clivada e a fita não clivada é transportada removendo assim o superenovelamento. No desenovelamento realizado pelas enzimas do tipo IB, a fita é clivada e uma das extremidades fica livre para girar ao redor da fita intacta (Fonte: DEKKER *et al.*, 2002).

Os dados obtidos com a co-cristalização da topoisomerase III de *E. coli* com DNA de fita simples, suportam o modelo proposto para a associação da fita simples de DNA com a topo I de *E. coli* e a clivagem dessa fita pelo resíduo de tirosina do sítio ativo (CHANGELA *et al.*, 2001). Adicionalmente, a estrutura da topoisomerase III mostra uma fenda (*groove*) que se dirige ao sítio ativo da enzima e onde DNA de fita simples pode ser reconhecido e ligado à proteína (CHANGELA *et al.*, 2001).

Uma característica deste modelo é que, quando as duas extremidades da fita clivada são reconectadas, a fita não clivada permanece dentro do orifício da enzima. Assim, antes da enzima iniciar outro ciclo de clivagem, passagem da fita e religação, esta deve abrir o orifício para liberar a fita capturada. Isso implica que somente uma superhélice é relaxada por ciclo (CHAMPOUX, 2002). Para

comprovar isso, Dekker e cols (2002) executaram um elegante experimento, no qual uma única molécula de DNA de aproximadamente 10 kb contendo uma pequena região despareada foi fixada através de uma de suas extremidades a uma lâmina de vidro. A outra extremidade da molécula foi ligada a uma esfera magnética. Controlando-se a força do campo magnético e a rotação do magneto foi possível introduzir superhélices na molécula de DNA. A introdução de superhélices resultou no encurtamento do DNA que pode ser detectado, por microscopia, pelo movimento vertical da esfera magnética para baixo. O relaxamento da superhélice pela topoisomerase foi, então, simplesmente medido pelo movimento reverso da esfera, já que o DNA relaxado apresenta um tamanho maior. Os resultados mostraram que o movimento vertical da esfera correspondia à extensão do DNA predita para o relaxamento de apenas uma única superhélice.

Acredita-se que por meio do mecanismo de 'enzima-ponte' as topoisomerases do tipo IA podem ajustar o nível do superenovelamento na célula, prevenindo o excesso de superenovelamento gerado pela DNA girase. A remoção de uma superhélice por vez permite o monitoramento do superenovelamento do DNA após cada ciclo de clivagem e religação. Quando o excedente de torção na molécula for liberado, a enzima cessa o relaxamento, se dissociando do DNA (DEKKER *et al.*, 2002). Entretanto, o espaço existente entre a região 5' e 3' do DNA clivado, não é grande o suficiente para a passagem da outra fita, e outros dados estruturais ainda precisam ser revelados para a explicação do mecanismo de abertura da proteína durante a passagem do DNA pelo sítio ativo (CHEN *et al.*, 2013).

Membros da segunda classe de enzimas do tipo I, as topoisomerases III são funcionalmente distintas das topoisomerases I. Como mencionado anteriormente, as topoisomerases III requerem DNAs hiperenovelados negativamente como substratos para relaxamento, sugerindo que essas enzimas necessitem de regiões de fita simples mais extensas do que aquelas acessadas pela topoisomerase I bacteriana. Por outro lado, topoisomerases III são muito mais eficientes em concatenar e decatenar DNAs circulares contendo descontinuidades (*gaps*) em uma das fitas. Além disso, topoisomerases III são encontradas associadas com helicases. Essas propriedades são compartilhadas

tanto por topoisomerasas III bacterianas quanto eucarióticas e são consistentes com a visão de que essas enzimas desempenham funções celulares distintas daquelas desempenhadas pelas topoisomerasas I (WANG, 1996; CHAMPOUX, 2002).

Topoisomerasas III estão envolvidas na dissociação de moléculas de DNA contendo regiões de fita simples, tais como aqueles intermediários formados durante a replicação, reparo ou recombinação do DNA. Dessa forma, topoisomerasas III poderiam clivar uma fita simples de DNA e promover tanto a passagem de outra fita simples como a de um segmento de DNA dupla fita através do corte. Se isso for realmente correto, então há a necessidade absoluta da enzima se manter associada com ambas as extremidades do corte gerado na fita do DNA, pois de outro modo a recaptura da extremidade 3' do corte para a religação da fita clivada pode ser dificultada. Assim, claramente um mecanismo tipo enzima-ponte é adequado para executar esse tipo de reação (CHAMPOUX, 2002).

A topoisomerase I de *E. coli* não é capaz de relaxar completamente superenovelamento negativo e a topoisomerase III de *E. coli* possui uma fraca atividade de relaxamento sob condições fisiológicas. Wang (1971) propõe que a atividade em DNA superenovelado negativamente está associada a simples fita, e que um DNA superenovelado positivamente que contenha uma simples fita também pode ser relaxado tanto por uma topoisomerase I quanto por uma topoisomerase III α (KIRKEGAARD & WANG 1985; PLANK *et al.*, 2005). Ambas as enzimas possuem essa atividade completa apenas quando há a disponibilidade de uma simples fita desapareada, fato que pode ser estimulado na natureza por condições não fisiológicas, como baixa força iônica e altas temperaturas que gerariam uma simples fita disponível para que essas enzimas atuem (CHEN *et al.*, 2013).

1.4.2 - TOPOISOMERASES IB

O mecanismo pelo qual as topoisomerasas da subfamília IB atuam é chamado de rotação da fita. Quando a enzima tipo IB cliva uma das fitas do DNA, ela se liga covalentemente à extremidade 3' do corte, enquanto que

interação entre a extremidade 5' do corte e a enzima é apenas de natureza iônica e não representa um empecilho para a rotação desse lado da fita clivada ao redor da fita intacta (WANG, 1996; CHAMPOUX, 2001). Entretanto, essa rotação não é livre, mas sim controlada. A enzima relaxa o DNA em passos controlados, o que foi confirmado por ensaios de atividade da topoisomerase IB humana e do vírus vaccinia que mostram que a fita clivada do DNA duplex gira em média 19 vezes antes que a religação ocorra (REDINBO *et al.*, 1998; KOSTER *et al.*, 2005; PERRY *et al.*, 2006). É possível que a liberdade para a rotação da fita clivada sobre o eixo da hélice aumente a velocidade dos processos de replicação dos cromossomos eucarióticos ou a velocidade do processo de transcrição de regiões do cromossomo. A estrutura cristalina da topoisomerase I humana é mais consistente com um modelo rotacional da fita clivada do que aquele da enzima-ponte proposto para as topoisomerases IA (FIGURA 5).

1.4.3 TOPOISOMERASE 1C

O mecanismo de ação para relaxamento do DNA utilizado por topo V de *M. kandleri* é o mecanismo “rotação da fita” o mesmo proposto para topo IB (TANEJA *et al.*, 2006) com o diferencial de que topo V possui também uma atividade de reparo que deve ser melhor caracterizada (RAJAN *et al.*, 2013).

1.5 TOPOISOMERASES DO TIPO II

As topoisomerases II clivam ambas as fitas da molécula. Esta operação envolve a ligação covalente de cada subunidade do dímero à extremidade 5' do corte gerado em cada fita do DNA, através de um resíduo de tirosina do sítio ativo. A mudança conformacional gerada pela ação da enzima afasta as extremidades do corte associadas à enzima, criando uma abertura ou intervalo que é conhecido como segmento G. Um segundo segmento de DNA, que pode ser da mesma molécula ou não, atravessa o intervalo criado, gerando relaxamento, catenação ou decatenação destas moléculas. Deste modo, o número de encadeamentos do DNA (linking number) muda a “passos duplos”. A ação destas enzimas requer Mg^{+2} e hidrólise de ATP, neste último caso, para a

reciclagem da enzima (CHAMPOUX, 2002; SCHOEFFLER & BERGER, 2008; CHEN *et al.*, 2013).

Todos os organismos vivos possuem pelo menos uma topoisomerase II, e a ausência dessa enzima causa uma diminuição ou interrupção do ciclo celular. Elas são classificadas como topoisomerase IIA e IIB, de acordo com sua sequência e estrutura. Apenas uma topoisomerase II é encontrada em leveduras, *Drosophila* e em alguns eucariotos, no entanto, todos os vertebrados possuem as duas subfamílias (IIA e IIB) (CHEN *et al.*, 2013).

Todas as topoisomerasas do tipo II presentes em bactérias contêm duas subunidades distintas e são, portanto heterodiméricas na sua estrutura básica, enquanto que estas enzimas em eucariotos são homodiméricas. Bactérias, como *E. coli*, possuem duas topoisomerasas do Tipo II (DNA girase e a DNA Topoisomerase IV). Apesar de haver uma sobreposição de funções destas enzimas, cada topoisomerase desempenha um papel particular na topologia do DNA. A DNA girase é a única topoisomerase capaz de gerar super-enovelamento negativo com o auxílio da hidrólise de ATP, sendo responsável pela geração deste tipo de enovelamento em cromossomos bacterianos (GELLERT *et al.*, 1976). A DNA girase é composta de duas subunidades (GyrA e GyrB), com pesos moleculares de aproximadamente 100 kDa, que se associam formando um tetrâmero (A₂B₂). Já a topoisomerase IV (KATO *et al.*, 1990) é a topoisomerase bacteriana envolvida na decatenação dos cromossomos recém-replicados (ZECHIEDRICH & COZZARELLI, 1995). A topoisomerase IV, na forma de holoenzima, é um tetrâmero, constituído de duas subunidades (parC e parE), com estreita homologia com as subunidades da DNA girase. Esta enzima também apresenta atividade de relaxar super-enovelamento negativo (PENG & MARIANS, 1995). Deste modo, tanto a topoisomerase I quanto a topoisomerase IV, apresentam atividades que previnem o aumento do super-enovelamento negativo por parte da DNA girase.

A maioria dos eucariotos superiores parece conter duas isoformas de topoisomerase II, denominadas topoisomerasas II α e II β . A topoisomerase II α é essencial, sendo encontrada em todos os tipos celulares. Esta enzima é responsável pelo desentrelaçamento das duas fitas duplas geradas durante a duplicação do DNA, contribuindo também para o relaxamento do DNA durante a transcrição e outros processos celulares. Já a topo II β apesar de ser dispensável

para a divisão celular, participa de processos de recombinação nos neurônios em desenvolvimento (WANG, 1996; CHAMPOUX, 2001, CHEN *et al.*, 2013).

1.6. FUNÇÕES BIOLÓGICAS

As DNA topoisomerasas participam em diversos eventos relacionados com o metabolismo do DNA, incluindo a replicação, a transcrição, a recombinação e a segregação cromossômica. As descobertas recentes de várias novas topoisomerasas, principalmente em genomas bacterianos, levantam novas questões sobre o papel dessas enzimas nos processos celulares. Estudos com mutantes nulos para esses genes têm ajudado a delinear as funções dessas enzimas tanto em procariotos como em eucariotos. Estudos mais recentes em sistemas eucarióticos têm identificado interações entre topoisomerasas e outras proteínas, tais como helicases e mostram que essas interações são em muitos casos, fundamentais para a viabilidade celular (DEKKER *et al.*, 2002).

A descoberta das topoisomerasas foi consequência dos estudos sobre os problemas topológicos gerados pela replicação semi-conservativa do DNA. Para a maioria dos processos celulares que precisam acessar a informação armazenada no DNA, a dupla hélice precisa se desenovelar, ainda que temporariamente, como na transcrição ou na recombinação, ou de modo permanente, como na replicação. A natureza circular dos cromossomos bacterianos e o grande tamanho do DNA em eucariotos excluem a livre rotação das fitas no desenovelamento como a solução para muitos problemas topológicos que ocorrem a partir da separação das fitas do DNA. Assim, durante a replicação e a transcrição, a movimentação da DNA polimerase ou RNA polimerase, respectivamente, gera superenovelamento no DNA, que precisa ser relaxado (WANG, 1996). Topoisomerasas são, portanto, necessárias para rapidamente relaxar as super-hélices positivas e/ou negativas acumuladas durante esses processos, a fim de permitir o avanço da forquilha de replicação, no caso da replicação, ou da síntese de RNA pela RNA polimerase. *E. coli* é equipada com quatro topoisomerasas (DNA girase, topoisomerase I, topoisomerase III e topoisomerase IV). Estudos mostraram que a replicação do DNA bacteriano ocorre eficientemente na presença da DNA girase,

topoisomerase III ou topoisomerase IV, mas não necessita de topoisomerase I, enquanto que a segregação dos cromossomos necessita das topoisomerasas III e IV. A topoisomerase I é necessária para prevenir o acúmulo de superenovelamento negativo e conseqüentemente mutações, e juntamente com a DNA girase regular o nível de superenovelamento cromossômico (HIASA *et al.*, 1994; ADAMS *et al.*, 1992, PEREZ-CHEEKS *et al.*, 2012).

Já as arqueas cujos genomas já foram anotados possuem a girase reversa, topoisomerase IB, topoisomerase III α , a topoisomerase VI e a topoisomerase V, esta última desse domínio (SLESAREV *et al.*, 2001; BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2008; MORALES *et al.*, 2011).

Muitos estudos sobre a replicação em eucariotos se baseiam na biologia da levedura *S. cerevisiae*. A replicação do DNA em leveduras pode ser finalizada com uma topoisomerase do tipo I ou do tipo II (DiNARDO *et al.*, 1984). É provável que a topoisomerase III também seja importante no processo de replicação. Mutantes top3 de *S. cerevisiae* crescem mais lentamente, enquanto que em *S. pombe*, a mutação do gene top3 é letal (GOODWIN *et al.*, 1999).

Distintamente das leveduras, a maioria dos eucariotos superiores contém duas isoformas de topoisomerase do tipo II (II α e II β). Topo II α é uma enzima essencial e é responsável pela separação dos cromossomos replicados. Topo II β é dispensável no processo de divisão celular. Contudo, mutações no gene topII β afetam o desenvolvimento neural de camundongos (CHAMPOUX, 2001).

Eucariotos superiores também contêm duas isoformas da topoisomerase III. Mutantes para topoisomerase III α não conseguem se desenvolver, já que a enzima é essencial para a sobrevivência durante os estágios iniciais do desenvolvimento (LI & WANG, 1998; PLANK *et al.*, 2005; MÖNNICH *et al.*, 2010).

Em *Drosophila*, topoisomerase III α está localizada na mitocôndria e a deleção desse gene causa uma redução no número de cópias de DNA mitocondrial e na quantidade de ATP disponível na célula, indicando uma possível atuação na replicação do DNA mitocondrial e, conseqüentemente, a redução na produção de ATP pela mitocôndria (WU, FENG, HSIEH, 2010). Experimentos com RNA de interferência para topoisomerase III α em *Caenorhabditis elegans* mostram que há uma grande variedade de alterações

celulares, incluindo anormalidades na proliferação de células germinativas, na ovogênese e na embriogênese (KIM *et al.*, 2000). Chen e cols (2013) sugerem que topoisomerase III α seja essencial na manutenção da estabilidade do genoma durante o desenvolvimento.

Em contrapartida, a falta da topoisomerase III β não é tão drástica para os estágios iniciais de desenvolvimento, porém, foram verificadas algumas alterações tardias como redução na fertilidade, desenvolvimento de autoimunidade e morte prematura de camundongos (KWAN & WANG 2001; KWAN, MOENS, WANG 2003; KWAN *et al.*, 2007). Mutantes para topoisomerase III β se mostraram também ineficientes na ativação da via P53 após danos causados por irradiação com luz UV em células murinas e acredita-se que a enzima seja preditora de sobrevivência em carcinomas mamários (MOHANTY *et al.*, 2008; OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2010).

Estudos realizados em *Drosophila* e levedura concluíram que a função da topoisomerase III α não é substituída pela topoisomerase III β (NG *et al.*, 1999; PLANK, WU, & HSIEH, 2006; SEKI *et al.*, 2006).

1.7. INTERAÇÕES COM OUTRAS PROTEÍNAS

Existe uma superfamília de helicases denominadas RecQ que estão implicadas em recombinação e reparo de DNA. Fazem parte dessa família as helicases RecQ1, BLM, WRN, RecQ4 e RecQ5 em mamíferos e SGS1 em *S. cerevisiae*. Mutações nos genes para essas proteínas estão associadas com as síndromes de Bloom, Werner e Rothmund-Thompson respectivamente, envolvendo predisposições a malignidades celulares. Estudos de imunoprecipitação e imunocitoquímica demonstraram que RecQ5 interage com as topoisomerasas III α e III β e co-localizam no núcleo de células de rim humanas (SHIMAMOTO *et al.*, 2000). Acredita-se que as topoisomerasas III influenciem também na estabilidade do genoma promovendo a clivagem de intermediários de recombinação juntamente com a helicase (RecQ), prevenindo um fenômeno de hiper-recombinação (KIM, CARON, WANG, 1995). Observou-se ainda que mutantes de *E. coli* para o gene topB parecem exibir uma alta frequência de recombinação entre sequências repetidas (SCHOFIELD *et al.*, 1992).

Mutações em SGS1 (uma helicase, que é homóloga da RecQ de *E.coli* em humanos), que interage tanto com a topoisomerase II quanto com a topoisomerase III (ROTHSTEIN & GANGLOFF, 1995; NITTIS, 1998) causam uma redução na longevidade das células, da mesma forma que acontece na síndrome de Werner em humanos (BENNETT, NOROIT-GROS, WANG, 2000; NG *et al.*, 1999). SGS1 não é essencial para a viabilidade de leveduras, mas elas, além de crescerem mais lentamente, tornam-se deficientes na capacidade de esporulação e adquirem um fenótipo de hiper-recombinação (ROTHSTEIN & GANGLOFF, 1995). Mutações no gene TOP3 de *S. cerevisiae* levam a um aumento de recombinação entre sequências repetitivas, não-disjunção de cromossomos na mitose e na meiose e, no caso de *S. pombe*, também a inviabilidade do mutante. Esse fenótipo é observado mesmo na presença das duas mais robustas topoisomerasas celulares (topo I e topo II). Mais ainda, mutantes *top3-* de *S. cerevisiae* apresentam telômeros significativamente menores e perda de elementos repetidos da região sub-telomérica (KIM, CARON, WANG, 1995).

Células tumorais e linhagens celulares imortalizadas conseguem manter o tamanho dos seus telômeros na ausência de telomerase. Essa manutenção se dá através de um ou mais mecanismos chamado ALT (alternative lengthening of telomeres) (HANDE *et al.*, 1999). Estudos demonstraram que células ALT possuem graves irregularidades na segregação dos cromossomos na ausência da topoisomerase III α , mas o mesmo perfil não ocorre em células que contêm telomerase. Isso sugere que a topoisomerase III α pode estar substituindo a telomerase nesse tipo celular (TEMIME-SMAALI *et al.*, 2008).

Uma característica em comum de linhagens celulares ALT, é a presença de estruturas nucleares, conhecidas como APBs (ALT-associated PML bodies). Nessas estruturas já foi identificado DNA telomérico, proteínas que se ligam a telômeros e proteínas envolvidas em recombinação e replicação (HENSON *et al.*, 2002). É interessante notar que a maioria das proteínas presentes nessas estruturas nucleares possuem atividades ligadas à topoisomerase III, são elas RAD51 (NORMAN-AXELSSON *et al.*, 2013) RPA (YANG *et al.*, 2012), BLM (XUE *et al.*, 2013) e WRN (AGGARWAL *et al.*, 2009).

Tanto a topoisomerase I quanto a topoisomerase II podem atuar no relaxamento do “stress” torcional causado pela abertura das fitas nas forquilhas

de replicação e transcrição. Entretanto, apenas a topoisomerase I é capaz de atuar especificamente na replicação dos fragmentos de Okazaki em levedura apesar de todas as outras funções poderem ser substituídas pela topoisomerase II. Em experimentos realizados em *D. melanogaster* e camundongos verificou-se que a topoisomerase I é essencial principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (LEE *et al.*, 1993), provavelmente atuando na fase S prevenindo a quebra do DNA e aberrações cromossômicas, como evidenciado em células B, onde a ausência da topoisomerase I aumenta 4,4 vezes a quebra de DNA na fase S (TUDURI *et al.*, 2009). Topoisomerase I possui também importante papel na iniciação da transcrição, interagindo com o fator transcricional TFIID, intermediando a formação do complexo TFIID-TFIIA (CHEN *et al.*, 2013).

Em condições normais, a topoisomerase I se liga ao DNA simples fita, clivado-o e formando um complexo enzima-DNA que catalisa a religação da fita clivada. Entretanto, em condições adversas essa re-ligação pode não ocorrer causando um dano irreversível durante a replicação ou transcrição. Esses complexos topo I-DNA se não forem rapidamente degradados podem gerar a errônea formação de um recombinante e acabar em morte celular (LEBEDEVA *et al.*, 2008). A formação do complexo DNA-topoisomerase I em humanos promove instabilidade genética e é uma das alterações celulares observadas antes da apoptose (POMMIER, 2006). Entretanto, a formação desse complexo pode ser desfeita quando submetido à presença de dois membros da família das polimerases (ADP-ribose) PARP-1 e PARP-2 (MALANGA & ALTHAUS, 2004).

1.8 - TOPOISOMERASES COMO ALVOS ANTIPARASITÁRIOS

Topoisomerases são alvos clinicamente importantes em diversas infecções e doenças (LIU, 1989; BAKSHI & SHAPIRO, 2003; DAS *et al.*, 2004b). Os inibidores de DNA topoisomerases podem ser divididos em duas classes: classe I e classe II (WANG, 1994). Os inibidores relacionados à classe I são ditos “venenos contra topoisomerase”, pois são drogas que estabilizam o complexo covalente enzima-DNA, impedindo que ocorra a religação da fita clivada. Esse complexo é também chamado de complexo fragmentário, pois quando rapidamente desnaturado (pelo uso de detergentes aniônicos, uréia,

guanidina) gera-se uma molécula de DNA ligada covalentemente, via fosfotirosina, a topoisomerase desnaturada. Acredita-se que o complexo enzima-DNA sirva como barreira para o avanço das maquinarias de replicação e transcrição, levando ao aumento de quebras no DNA e a ativação do processo de apoptose (LIU *et al.*, 1995). Uma vez que uma topoisomerase é um componente necessário no complexo fragmentário, níveis aumentados da enzima levam a um aumento da toxicidade do veneno. Nessa classe estão incluídos:

(a) os inibidores bacterianos da DNA girase, tais como as quinilonas e fluoroquinolonas. Uma observação bastante interessante é que tripanossomas e plasmódios são sensíveis a fluoroquinolonas, geralmente consideradas seletivas para topoisomerasas II procarióticas (GARCÍA-ESTRADA, 2010). Essas drogas são candidatos particularmente atraentes como drogas anti-parasitárias devido a relativa resistência das topoisomerasas de mamíferos à sua ação.

(b) os inibidores etoposídeo e teniposídeo, que possuem efeitos contra a topoisomerase II eucariótica e também sobre a topoisomerase II de tripanosomas e plasmódios.

(c) drogas como a camptotecina, inibidora da topoisomerase I eucariótica (GRABOWSKI *et al.*, 1999; ALAGOZ *et al.*, 2012). Derivados menos tóxicos desse inibidor, tais como topotecan e irinotecan são atualmente usados na clínica para tratamento de câncer de ovário, de pulmão, gastrointestinal, cerebral e cervical (DANCEY & EISENHAUER, 1996; revisto por POMMIER, 2013). A camptotecina atua estabilizando o complexo DNA clivado-topoisomerase. Estudos mostram que, o resíduo de nucleotídeo na posição +1 do corte da fita do DNA gerado pela topoisomerase I humana, na presença de camptotecina, é preferencialmente uma guanina, mostrando que a droga interage também com esse nucleotídeo na extremidade da fita clivada (JAXEL *et al.*, 1991; PORTER & CHAMPOUX, 1989). A camptotecina também mostrou ser tóxica também para alguns tripanossomatídeos patogênicos como *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. donovani* e *L. mexicana* (BODLEY *et al.*, 1995; VALDÉS-REYES *et al.*, 2009; WORTHEN, JENSEN, PARSONS 2010; PRADA *et al.*, 2013).

As drogas da classe II são referidas como “inibidores de topoisomerasas” e interferem nas funções catalíticas das topoisomerasas sem interferir no complexo covalente enzima-DNA. Elas podem se ligar diretamente a

topoisomerase ou, ao se ligar, induzir alterações no DNA. Geralmente, esses inibidores não são específicos para as topoisomerasas. Nessa classe de drogas estão incluídas a cumermicina e a novobiocina, que agem sobre a DNA girase, impedindo a ligação do ATP e os inibidores de topoisomerase eucariótica II como suramina, aclarubicina, salvicina, fostriecina, merbarone e bis-(2,6-dioxopiperizinas) (SNYDER, 2003; BAILLY, 2012). A ação desses inibidores sobre topoisomerasas II não é completamente entendida.

1.9 - TOPOISOMERASES NO CONTEXTO DA DOENÇA DE CHAGAS

O parasita *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida). Os membros da família Trypanosomatidae têm em comum a presença de cinetoplasto, que representa um compartimento especializado de uma única mitocôndria e contém grande quantidade de DNA (kDNA) (revisto por MASLOV & SIMPSON, 1995), compartimentalização da via glicolítica em glicossomas (revisto por OPPERDOES, 1995) e ainda um único flagelo.

A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo é um dos critérios utilizados para definir as formas evolutivas presentes na família Trypanosomatidae (HOARE & WALLACE, 1966). Em *T. cruzi*, nas formas epimastigotas o cinetoplasto encontra-se em posição anterior ao núcleo e em análises ultraestruturais apresenta-se em forma de bastão constituído por material filamentososo disposto como feixes de fibras firmemente empacotados e perpendicularmente orientado em relação ao eixo longitudinal do protozoário. Nas formas tripomastigotas, o cinetoplasto localiza-se posterior ao núcleo, apresenta-se de forma arredondada e os filamentos não estão firmemente empacotados. As formas amastigotas são células arredondadas e o cinetoplasto apresenta ultraestrutura semelhante à de epimastigotas (revisto por De SOUZA, 1983; SOARES, 1989).

Durante seu ciclo na natureza, o *T. cruzi* alterna formas replicativas com formas não replicativas e infectivas. As formas tripomastigotas, que infectam as células dos mamíferos, transformam-se em amastigotas que se multiplicam no ambiente intra-celular. Após vários ciclos de multiplicação, os amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas que, liberados na corrente

sanguínea podem invadir outras células ou ser injetados pelos triatomíneos (insetos da família Reduviidae), durante o repasto de sangue no hospedeiro mamífero. Os tripomastigotas ingeridos pelo inseto transformam-se em epimastigotas, que por sua vez se multiplicam no tubo digestivo do inseto. Na porção terminal do tubo digestivo do triatomíneo ocorre a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese). Estas formas infectivas são liberadas nas excreções (urina e fezes) do inseto durante o repasto de sangue no mamífero, fechando-se assim o ciclo do *T. cruzi* na natureza (De SOUZA, 1983).

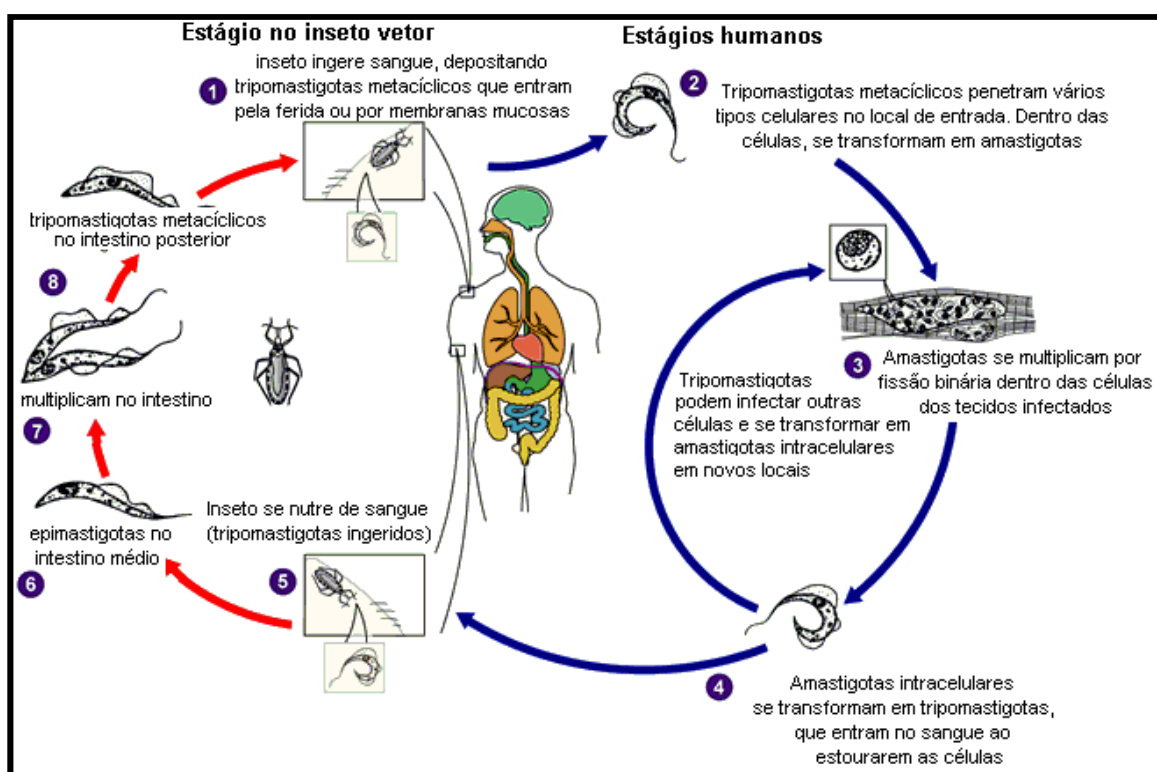


FIGURA 7 - CICLO DE VIDA DE *T. cruzi* (Fonte: Modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

A doença de Chagas é uma das grandes endemias da América Latina, afetando aproximadamente 18 milhões de indivíduos e colocando em risco outros 100 milhões, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm). O quadro é agravado pela migração crescente de pessoas de áreas endêmicas para zonas urbanas dentro do continente e para países desenvolvidos, fato relevante no contexto da transmissão através da transfusão sanguínea; a segunda maior causa de

aquisição da doença. Os fármacos que são administrados atualmente para o combate ao parasita (nifurtimox e benzonidazol) foram introduzidos empiricamente a partir da década de 1960. Esses fármacos tratam principalmente infecções agudas e, apesar da obtenção de 50% de cura, causam sérios efeitos colaterais. Na fase crônica da doença aproximadamente 30% dos pacientes desenvolvem doença cardíaca, digestivas ou ambas, incapacitando o doente para o trabalho (DIAS, 2000; COURA & De CASTRO, 2002). A doença de Chagas é uma doença que gera gastos com saúde pública elevados, requerendo infra-estrutura clínica especializada (SCHMUÑIS, 2000). Portanto, a busca de novos alvos para o tratamento quimioterápico efetivo contra o *T. cruzi* deve ser incentivada não apenas para produzir drogas mais eficientes e sem efeitos colaterais sérios, mas também diminuir os custos com o tratamento de doentes crônicos para o ministério da saúde.

Em tripanosomatídeos, várias topoisomerasas já foram caracterizadas (revisto por DAS *et al.*, 2006). Ênfase tem sido dada principalmente ao estudo das topoisomerasas do tipo II, devido ao envolvimento dessas enzimas na replicação do DNA mitocondrial (kDNA) desses protozoários (SHAPIRO & ENGLUND, 1995). A inibição da replicação do kDNA, pela supressão da atividade da topo II mitocondrial, leva a morte do tripanosomatídeo (WANG & ENGLUND, 2001). Esse fato, associado à característica da rede de kDNA ser uma estrutura unicamente presente nos tripanosomatídeos faz da topo II um importante alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1990, CAVALCANTI *et al.*, 2004; revisto por DAS *et al.*, 2006 e DIAZ-GONZALEZ *et al.*, 2009).

A análise do genoma do *T. cruzi* (www.genedb.org) mostra que este codifica sete diferentes topoisomerasas. Três destas topoisomerasas são do tipo II: TcTopoII α e TcTopoII β nucleares e a TcTopoII mitocondrial. Há quatro topoisomerasas do tipo I: uma topoisomerase da subfamília IB (TcTopo I) e três topoisomerasas da subfamília IA (TcTopoIII α , TcTopoIII β e TcTopoIA mitocondrial).

Pouca relevância foi dada as topoisomerasas do tipo I como alvos quimioterápicos, porque basicamente não se conheciam inibidores específicos para essas enzimas. Com a descoberta da camptotecina (DANCEY & EISENHAUER, 1996), um inibidor específico para topo I eucariótica no final

do século XX, essas enzimas começaram a ganhar destaque. Estudos sobre topoisomerasas I de *T. brucei*, *L. donovani* e *T. cruzi* tem contribuído para o melhor entendimento sobre a estrutura e função dessas proteínas, inclusive no que diz respeito à inibição pela camptotecina e seus derivados (BODLEY *et al.*, 1995; BODLEY *et al.*, 2003; ZUMA *et al.*, 2011). Outra recente descoberta se refere à topoisomerase IA mitocondrial em tripanosomatídeos, que tem características procarióticas. De novo, a supressão desta atividade enzimática em *T. brucei* leva a perda do kDNA e conseqüentemente à morte do parasita, constituindo-se em um potencial alvo quimioterápico (TANG & SHAPIRO, 2010).

Pouco é conhecido sobre topoisomerasas do tipo I de *T. cruzi*. Em virtude desse fato, resolvemos caracterizar os genes que codificam essas enzimas nesse parasita como ponto de partida para dimensionar a sua importância nos processos de replicação, transcrição e recombinação do genoma do *T. cruzi*. E, conseqüentemente, estabelecer a relevância dessas enzimas como alvos de estudos para o tratamento da doença de Chagas e de outras doenças causadas por tripanosomatídeos (UMAKI, 2005).

Iniciamos alguns anos atrás a caracterização da topoisomerase I de *T. cruzi*, uma vez que em tripanosomatídeos essa enzima é heterodimérica, ao contrário de outros eucariotos; o que a torna alvo potencial importante para inibidores específicos. Nossa hipótese é que a topoisomerase I tenha papel relevante no processo de transcrição no *T. cruzi* e em outros tripanosomatídeos, uma vez que a regulação da expressão gênica, nesse grupo de microorganismos, se dá ao nível pós-transcricional (revisto por CLAYTON, 2002). Isso significa que o parasita deve ter uma atividade transcricional intensa ao longo de todo o genoma, gerando constantes alterações no grau de superrenovamento do DNA devido passagem das RNA polimerases e, portanto, necessitando da intervenção frequente das topoisomerasas I.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os genes e proteínas que codificam as DNA topoisomerasas III α e III β em *T. cruzi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in silico* os genes *TcTOPO3 α* e *TcTOPO3 β*
- Obter mutantes nulos *Tctopo3 α ^{-/-}* e *Tctopo3 β ^{-/-}* através da técnica de nocaute gênico.
- Avaliar a viabilidade dos mutantes *Tctopo3^{-/-}* de *T. cruzi* frente à exposição aos agentes genotóxicos fleomicina e hidroxiuréia.
- Análisar do cariótipo dos mutantes *Tctopo3^{-/-}* por eletroforese em campo pulsado (PFGE).
- Análisar das interações de TcTOPO3 (α e β) com outras proteínas através de imunoprecipitação de proteínas.
- Avaliar a participação das topoisomerasas no controle do ciclo celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - REAGENTES

GE: dNTPs; membrana de nitrocelulose Hybond C; membrana de nylon Hybond N; filmes de raio-X Hyperfilm[®], anticorpo monoclonal anti-Histidina; kit ECL de *western blotting*; corante fluorescente para DNA Hoechst 33342; radioisótopo α -[P³²]-dCTP (10 μ Ci/ μ l; 3.000 Ci/mmol); colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant).

BioAgency: Cubetas de eletroporação estéreis com *gap* de 0,2 cm.

Bio-Rad: Acrilamida, Agarose (UltraPure DNA grade); Azul de Bromofenol; Bis-Acrilamida; Persulfato de Amônia; marcador de massa molecular na faixa de 1,05 a 3,13 Mpb (CHEF DNA - *H. wingei Chromosomes*).

Cultilab: Soro Fetal Bovino

Difco: Bacto-água; Bacto triptona; Extrato de levedura;

Dupont: Tela intensificadora para revelação em filmes de raios-x (Dupont Cronex Lightining Plus).

Invitrogen Inc.: T4 DNA ligase, EDTA, Fenol, Trizma base, Nick Translation Kit, Taq DNA polimerase, IPTG, agarose, marcador de massa molecular Bench Mark, 1 kb Plus DNA Ladder, Platinum Taq DNA polimerase *high fidelity*.

Merck: Acetato de Sódio; Ácido Acético Glacial; Cloreto de Cálcio; Cloreto de Sódio; Etanol absoluto; Glicina; Glicose; Hidróxido de sódio; Isopropanol; Lauril Sulfato de Sódio; Metanol.

New England Biolabs: Endonucleases de Restrição.

Promega: Reagentes para revelação com fosfatase alcalina (NBT e BCIP).

Qiagen: QIAprep Spin Miniprep kit.

Roche: Pastilha de inibidores de protease.

Serva Electrophoresis: Alu-Gel S.

Sigma: Acetato de amônia; Ampicilina; Brometo de Etídeo; BSA; Cloreto de Cálcio; Cloreto de Magnésio; DNA de esperma de salmão; Ficoll; Formamida; Glicerol; HEPES; Kanamicina; Tetraciclina; Tween 20; Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488; Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina; Adjuvantes completo e incompleto de Freund; β -mercaptoetanol; Neomicina (G418); Higromicina; Coluna C18 Empore, Peptídeos 3xFLAG, Gel de afinidade M2 FLAG, Inibidor de protease E-64.

USB: Sacarose.

3.2 - MEIOS DE CULTURA

Meio LB (Luria-Bertani): Bacto-triptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; Extrato de levedura 5 g/L.

Meio LB/Ampicilina: LB acrescido de ampicilina 100 μ g/mL.

Meio LB/Kanamicina: LB acrescido de kanamicina 25 μ g/mL.

Meio LB/Tetraciclina: Meio LB acrescido de tetraciclina 15 μ g/mL.

Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) - Infusão de fígado e triptose: Infusão de

fígado 5 g/L; NaCl 4,40 g/L; KCl 0,40 g/L; Glicose 2,20 g/L; Triptose 5 g/L; Fosfato Dibásico de Sódio 11,55 g/L; Extrato de Levedura 16 g/L; Hemina 0,02 g/L; Soro Fetal Bovino 10%.

3.3 - TAMPÕES E SOLUÇÕES

Fenol/Clorofórmio: Fenol saturado 25 volumes; Álcool isoamílico 1 volume; Clorofórmio 24 volumes.

Mix de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham Biosciences) foram misturados e diluídos em Tris-HCl 10 mM pH 7,5 para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo. Mantido a – 20 °C.

PBS: NaCl 150 mM; Tampão fosfato 20 mM pH 8,0.

PBST: PBS contendo o detergente *Tween* 20 na concentração de 0,05%.

Solução de alta estringência: SSC 0,1X; SDS 0,1%.

Solução de baixa estringência: SSC 2X; SDS 0,1%.

Solução de média estringência: SSC 1X; SDS 0,1%.

Solução de bloqueio para imunofluorescência: solução contendo PBS e albumina sérica bovina (BSA) 1 %.

Solução de bloqueio para *western blot*: PBS 1X, *Tween* 20 0,05%; leite em pó desnatado 5%.

Solução de coloração para géis de proteína: *Coomassie blue* R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%).

Solução de *denhardt* (50x): Ficoll 0,5%, polivinilpirrolidona 0,6% e albumina de soro bovino 0,2%.

Solução de depuração para *southern blot*: HCl 0,25 M.

Solução de estoque para células cálcio-competentes: CaCl₂ 100 mM; HEPES 10 mM pH 7,0; glicerol 10 %.

Solução de hibridação para *southern blot*: DNA de esperma de salmão do

tipo III 0.1 mg/mL fragmentado por ultra-som e desnaturado; SSC 6x; solução de *Denhardt* 6x; SDS 1%.

Solução de lise para eletroforese de pulsos alternados (PFGE): EDTA 0,5 M pH 9,0; Sarcosyl 1%, Proteinase K 0,5 mg/mL.

Solução de lise para *toothpick*: NaOH 60 mM, glicerol 6%, SDS 0,6%, EDTA 6 mM; azul de bromofenol 0,026%.

Solução de *ponceau s*: Ponceau S (Sigma P-3604) 0,5%, Ácido acético glacial 1%.

Solução desnaturante para *southern blot*: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.

Solução neutralizante para *southern blot*: Tris HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M.

Solução para descoloração de géis de proteína: Metanol 4%, ácido acético 7,5%.

Solução PSA 2%: Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM; Agarose *Low Melting* 2%.

Solução PSG: Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%.

SSC 20x: NaCl 3M pH 7,0; Citrato de sódio 0,3M.

Tampão da fosfatase alcalina: Tris-HCL 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 400 25%, Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol FF 0,25%.

Tampão de amostra para proteína 4x: Tris-HCl 125 mM pH 5,8; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; Glicerol 12%; azul de bromofenol 0,012%.

Tampão de eletroforese para géis de proteína 5x: Tris 0,037M, glicina 0,3M pH 8,4, SDS 0,1%.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: Tris-base 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%

Tampão de eletroporação de *T. cruzi*: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM.

Tampão de transferência para *western blot*: Tris base 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%.

Tampão TELT: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4%.

TBE 10X: Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM.

Tampão de desnaturação: uréia 6 M; tiouréia 2 M; HEPES 10 mM (pH 8,0).

Tampão de digestão: bi-carbonato de amônio (NH_4HCO_3 , ABC) 50 mM em água.

Tampão de redução: DTT 10 mM em ABC 50 mM.

Tampão de alquilação: iodacetamida 55 mM em ABC 50 mM.

Solução A: 0,1% ácido fórmico em água.

Solução B: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila.

TMK: 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl_2 e 50 mM KCl.

Tampão de lise 10x: 1x TMK, 10% NP-40 e 2,0 M sacarose.

Tampão TBS: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl.

Tampão TBS40: TBS, 0,5% NP40.

3.4 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS:

Quadro 1

NOME	SÍTIO	SEQUÊNCIA 5' – 3'
TOP3AF	<i>Bam</i> HI	GATGAGGGATCCATTGGGACCGATGCCACGATAG
TOP3AR	<i>Sal</i> I	GGGTGCGACTCAATCTAGCCACTGGAAAAAGGAACACTT TCGAGCAGCACAT
TOP3BF	<i>Bam</i> HI	TCATTGGATCCATGGAGAAACATGGCATCGGCACGG
TOP3BR	<i>Sal</i> I	CCCTGTGCGACTCATCTGCCCTACCGCCGCGTCCCCGT
TOP3AKPNF	<i>Kpn</i> I	GTCCGGTACCAACGGTACCTGCAGGATGGGC
TOP3ASALR	<i>Sal</i> I	GATGGTTCGACTCCTGTTGACCCCTGA
TOP3ABAMF	<i>Bam</i> HI	TATGGGATCCTTTTGGTGGTATGCCGAGTGTC
TOP3AXBAR	<i>Xba</i> I	GGAATCTAGAAAAGAACACTTTCGAGCAGCACAT
EXT3AR	-----	CAGTCCCTACGAAGATGATCCGTCGCCGAGC
3AINTF	-----	GGTGTACCCGTATGAACGATGGCA
3AINTR	-----	AGTGCCGGGAGGCGGCGATGTAAAC
TOP3BKPN	<i>Kpn</i> I	CCGCACGGTACCGATGGTGGCGGAGAAAC
TOP3BSAL	<i>Sal</i> I	GCGCGTCGACGCAACACCCACCTTCAGGTCCAAC
TOP3BBAM	<i>Bam</i> HI	GAAGAGGATCCAAAACAGAGAGGAGGACGACAGCAT
TOP3BXBA	<i>Xba</i> I	CTGCTCCCTCTAGAGCCCCTACCGCCGCGTCCCCGT
EXT3BF	-----	CATCGCACCTCATTTCATTCTCGACATTTATG
3BINTF	-----	ACACTCGGGCGAGGCCTACTGCT
3BINTR	-----	CTTCAGATACCGCATACAGTTTCCGC
3AGTWF	Recombinação	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCG ACATGGTTGAATGTTGCAG
3AGTWR	Recombinação	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATCTAGC CACTGGAAAAAAGAACACTTTCGA
3BGTWF	Recombinação	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGC CGCACCGTACTGATGGTGGCGGAG
3BGTWR	Recombinação	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATACCGG CCCCTGCTCCCTCCTCTG
NEOF	-----	CGTTCTAGATGATTGAACAAGATGGATTG
NEOR	-----	AGAGCCGCGGTCAGAAGAACTCGTCAA
HIGROF		GGGGGAAGCTTATAAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC
HIGROR		GGGTGAATTCTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG

Quadro 1: Sequência dos iniciadores utilizados para as ampliações e clonagens. Destacado em cinza estão os sítios utilizados para clivagem com enzima de restrição ou sítios para recombinação plataforma Gateway (Invitrogen).

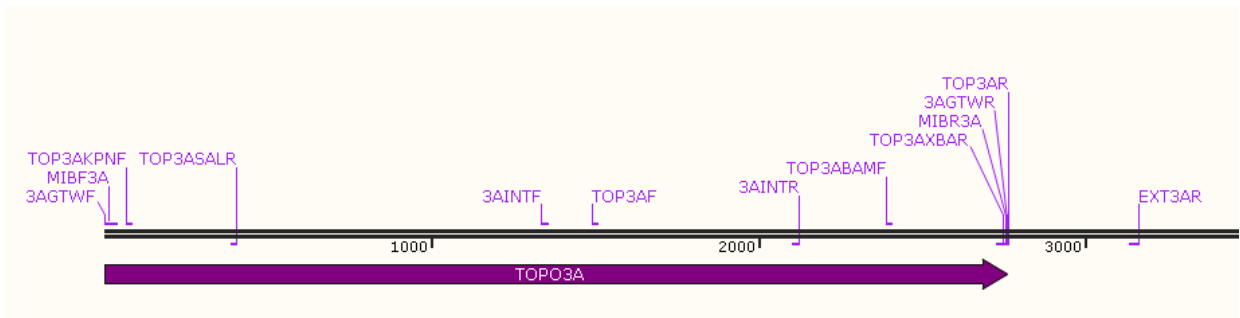


FIGURA 8 - Desenho esquemático da localização dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da TcTOPO3 α .

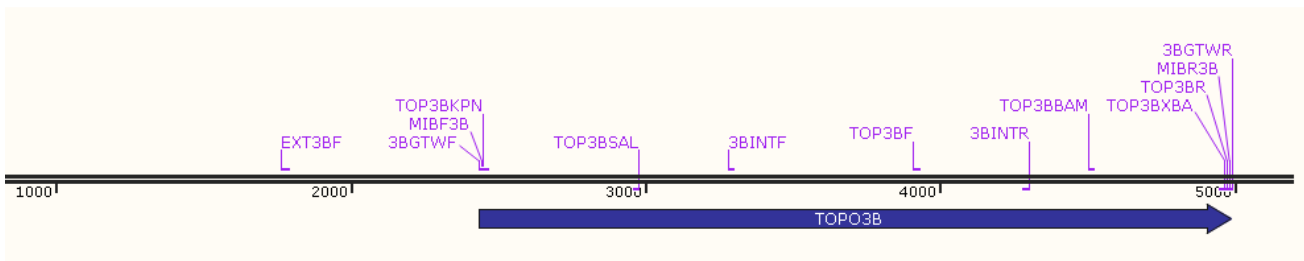


FIGURA 9 - Desenho esquemático da localização dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da TcTOPO3 β .

3.5 – TÉCNICAS

3.5.1 - MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Plasmídeos foram purificados com base no método da lise alcalina (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Os clones recombinantes foram cultivados em 2 mL de LB/amp, a 37 °C por 16 a 18 horas. Os plasmídeos foram purificados utilizando o sistema Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante.

3.5.2 - PREPARAÇÃO DE *E. coli* CÁLCIO-COMPETENTE

A bactéria *E. coli* cepa TOP10F' foi preparada segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Uma alíquota de 10 µL do estoque em glicerol da bactéria mantida a – 20 °C, foi inoculada em 6 mL de meio LB/tet e incubada por 16 horas à 37°C sob agitação constante (pré-inóculo). Um mL do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL no meio LB/tet e incubado à 37 °C, sob agitação constante, durante tempo suficiente para que alcançasse a fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} = 0,6$).

Após esse tempo, a cultura foi colocada no gelo por 15 min. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x *g* por 6 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em uma solução gelada de CaCl₂ 100 mM, tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0, em um volume final correspondente a metade do volume da cultura original. As células foram novamente coletadas por centrifugação, nas mesmas condições anteriores, ressuspenso gentilmente com a solução anterior, acrescida de glicerol 10% (1/50 do volume da cultura original) e mantidas no gelo por 2 horas, sendo em seguida armazenadas a – 70°C.

3.5.3 - TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

As reações de ligação foram incubadas com 100 μ L da suspensão de *E. coli* Top10F' competente, por 30 min no gelo. Após esse período, as suspensões bacterianas foram submetidas ao choque térmico a 42°C por 1 min e imediatamente colocadas no gelo por 2 min antes da adição de 1 mL de meio LB. As células transformadas foram incubadas sob agitação constante em LB à 37°C por uma hora. Alíquotas de 100 μ L e 200 μ L foram espalhadas em placas contendo meio LB/Amp e incubadas à 37°C por 18 horas.

3.5.4 - SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

3.5.4.1 - SELEÇÃO PELA TÉCNICA DA PALITAGEM (*TOOTHPICK*)

A análise preliminar dos clones recombinantes foi feita através da técnica de palitagem (*toothpick*). Resumidamente, as colônias que cresceram no meio seletivo, e que podem apresentar plasmídeos recombinantes, foram coletadas com auxílio de palitos de dente estéreis e espalhadas no fundo de um tubo de micro-centrifuga. Os mesmos palitos foram usados para perfurar suavemente a superfície uma placa contendo meio LB/Amp (placa mãe), que foi incubada a 37 °C durante 12 horas. Aos tubos, devidamente numerados, foram adicionados 10 μ L da solução de lise. A lise procedeu-se em banho a 56°C durante 10 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, a uma tensão constante de 100 V.

Depois da eletroforese, o DNA foi visualizado na presença de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) por aproximadamente 20 minutos e lavado com água bidestilada. O DNA foi então observado sob luz ultravioleta e fotografado no sistema de foto-documentação L PIX (Loccus biotecnologia).

3.5.4.2 - PCR DE COLÔNIA

As colônias selecionadas pela técnica da palitagem foram diluídas em água ultrapura e lisadas por fervura por 5 minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas e um microlitro do sobrenadante foi adicionado a 19 μ L de uma mistura de PCR contendo 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de cada dNTP, $MgCl_2$ 1.5 mM, 10x tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os reagentes foram misturados e aquecidos por 4 min. a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel agarose 1%.

3.5.5 - PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO FENOL/CLOROFÓRMIO

Ao material a ser purificado foi adicionado o mesmo volume da solução fenol/clorofórmio. Após intensa agitação até a formação de uma emulsão, a amostra foi submetida a uma centrifugação a 5000 x *g* por 2 min. A fase aquosa (fase superior) foi cuidadosamente recolhida e depositada em um novo tubo de microcentrífuga, foi adicionado a esse material acetato de sódio pH 6,0 na concentração final 0,3 M. Após homogeneização, foram acrescentados 2-3 volumes de etanol absoluto. O material ficou precipitando por 16 horas a -20 °C ou por 20 min em gelo seco. A amostra foi centrifugada por 30 min, 10000 x *g*, a 4 °C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado novamente por 15 min, 10.000 x *g*, a 4 °C. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em água ou TE.

3.5.6 - NOCAUTE GÊNICO

3.5.6.1 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE *TcTOPO3 α*

As regiões compreendendo os nucleotídeos 67 a 401 (5'CDS3 α) (334 pb) e 2391 a 2747 (3'CDS3 α) (356 pb) da região codante do gene *TcTOPO3 α* foram amplificadas por PCR, usando, respectivamente, os pares de primers TOP3AKPN+TOP3ASAL e TOP3ABAM+TOP3AXBA (Quadro 1). Para as reações de PCR foram utilizados 100 ng do DNA genômico de *T. cruzi*, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os reagentes foram misturados e aquecidos por 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados por extração com fenol/clorofórmio. O fragmento 5'CDS3 α foi digerido com as enzimas *KpnI* e *SalI*, enquanto que o fragmento 5'CDS3 β foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XbaI*. As reações de digestão foram realizadas a 37°C utilizando-se 20 unidades de cada enzima e tampão apropriado por 16 horas.

3.5.6.2 – AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DO GENE *TcTOPO3 β*

As regiões compreendendo os nucleotídeos 17 a 544 (5'CDS3 β) (527 pb) e 2069 a 2531 (3'CDS3 β) (462 pb) da região codante do gene *TcTOPO3 β* foram amplificadas por PCR usando, respectivamente, os pares de primers TOP3BKPN+TOP3BSAL e TOP3BBAM+TOP3BXBA (Quadro 1). As reações de PCR, bem como as etapas de purificação e digestão dos fragmentos foram feitas como descrito para o gene *TcTOPO3 α* (item 3.5.6.1).

3.5.6.3 – CLONAGEM NO VETOR pNEO2

O vetor pNEO2 construído no nosso laboratório, foi digerido com as enzimas *KpnI* e *SalI* para a clonagem do fragmento 5'CDS3 α ou fragmento 5'CDS3 β . Plasmídeo e insertos foram ligados em reação contendo T4 DNA ligase de acordo com procedimento padrão (SAMBROOK *et al*, 1989). O plasmídeo recombinante resultante de cada clonagem foi então digerido com as enzimas *BamHI* e *XbaI* para a inserção do fragmento 3'CDS3 α ou do fragmento 3'CDS3 β , gerando, respectivamente, os plasmídeos recombinantes pNEO2 Δ TOP3 α ou pNEO2 Δ TOP3 β . Clones recombinantes foram selecionados pela técnica da palitagem.

As clonagens dos fragmentos 5'CDS3 α /3'CDS3 α ou 5'CDS3 β /3'CDS3 β foram analisadas por PCR, utilizando as combinações de iniciadores conforme indicado pelas setas na figura 6.

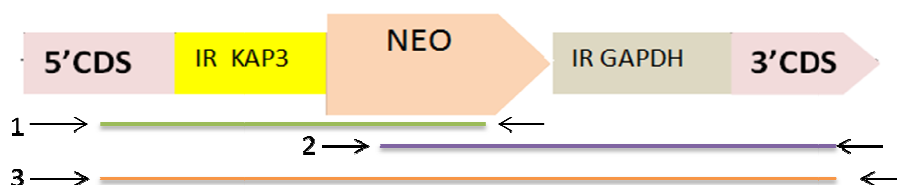


FIGURA 10. Esquema de amplificação utilizado para avaliação das clonagens em pNEO 2. As combinações de iniciadores foram: 1) TOP3KPN + NEOR; 2) NEOF + TOP3XBA; 3) TOP3KPN + TOP3XBA.

3.5.6.4 - AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES 5'CDS-NEO-3'CDS

Os cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS referem-se aos fragmentos amplificados a partir dos plasmídeos recombinantes pNEO2 Δ TOP3 α e pNEO2 Δ TOP3 β , usando os primers TOP3KPN e TOP3XBA respectivos. Esses fragmentos de DNA (cassetes) foram usados para a transfecção do *T. cruzi*.

Para obtenção dos dois cassetes 5'CDS-NEO-3'CDS (alfa e beta) para a transfecção, foram feitas reações de PCR (50 μ L), totalizando 1 a 2 mL. Para cada reação (50 μ L) foram utilizados: 2 ng do plasmídeo pNEO2 Δ top3

correspondente, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de cada dNTP, $MgCl_2$ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os reagentes foram misturados e aquecidos por 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 3 minutos.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram submetidos á eletroforese em um gel de agarose 0,8 % por 16 horas. O DNA foi corado com brometo de etídeo. As bandas de interesse foram cortadas do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. O DNA foi então extraído do gel por eletroeluição em tampão TBE 1x por 1 hora a 100 volts, seguido da purificação com fenol/clorofórmio, precipitação por 16 horas com 1/10 volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto a -20 °C. Após a precipitação o material foi ressuspensão em TE estéril e quantificado por espectrometria a 260 nm.

3.5.6.5 - TRANSFEÇÃO DO *T. cruzi* COM OS CASSETES 5'CDS-NEO-3'CDS

Para as transfeções de *T. cruzi* Dm28c usamos o procedimento descrito por Souza *et al.* (2010), com modificações. Formas epimastigotas (10^8 células) em fase exponencial de crescimento foram coletadas por centrifugação a 6.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular foi lavado por duas vezes em 1 mL de PBS estéril e as células foram coletadas novamente por centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os parasitas foram então ressuspensos em 1 mL de tampão para eletroporação (NaCl 140 mM, Hepes 25 mM, pH 7,5, Na_2HPO_4 0,74 mM). Quatrocentos microlitros de cada suspensão celular foram misturados com 10 μ g do cassete 5'CDS-NEO-3'CDS (3 α ou 3 β) em uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm de gap (BIORAD). Uma alíquota da suspensão de parasitas na qual não foi adicionado o cassete também foi submetida à eletroporação (controle negativo). As amostras foram submetidas a dois pulsos de 450 volts e 500 μ F em

eletroporador GenePulser II (BioRad) e posteriormente inoculadas em 10 mL de meio LIT contendo 1000 unidades de penicilina e 10 µg de streptomina. As culturas foram mantidas a 28°C em estufa BOD. Após 24 horas de cultivo, foram adicionados 500 µg/mL do antibiótico G418 (análogo da neomicina) para seleção da população resistente. As culturas transfectadas foram mantidas em meio LIT+G418 por 7 a 10 dias. Após este tempo, foram diluídas (1:4) em 10 mL de LIT+G418 e incubadas por 5 a 8 dias a 28 °C. Esse procedimento se repetiu até que o controle negativo (células transfectadas sem cassete) não apresentasse crescimento em meio LIT+G418 (aproximadamente 20 dias depois da transfecção). O DNA total das populações de parasitas transfectados e estáveis foi extraído para a análise da integração dos cassetes nos loci *TOPO3* (alfa e beta) correspondentes.

Os parasitas, nos quais um dos alelos dos genes *TcTOPO3* foi inativado pela inserção do gene *neo*, foram denominados de *T. cruzi*^{*TOP3α/Δtop3α::neo*} (locus *TcTOPO3α*) e de *T. cruzi*^{*TOP3β/Δtop3β::neo*} (locus *TcTOPO3β*), conforme nomenclatura sugerida por Clayton *et al.* (1998).

3.5.6.6 - EXTRAÇÃO DO DNA DE *T. cruzi*

A extração do DNA de *T. cruzi* foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta & Cross (1993). Aproximadamente 5×10^7 epimastigotas mantidos em fase exponencial (3 - 4 dias) foram coletadas por centrifugação a $4.000 \times g$ por 10 min a 4°C, lavadas em PBS e ressuspensas em 500 µL de tampão TELT. O material foi incubado por 5 min à temperatura ambiente e o DNA foi extraído com o mesmo volume de fenol/clorofórmio. Após centrifugação a $13.000 \times g$ por 5 min, a fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com o dobro do volume de etanol absoluto e coletado por centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 min. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida ressuspendido em tampão TE contendo RNase.

3.5.6.7 - AVALIAÇÃO DA INSERÇÃO DOS CASSETES NO GENOMA DE *T. cruzi*

Para confirmação da correta inserção dos cassetes no genoma, utilizamos iniciadores externos aos genes de interesse em conjunto com os iniciadores do gene NEO e os iniciadores que amplificam o cassete inteiro. Essa estratégia se baseia no fato de que se o cassete 5'CDS-NEO-3'CDS se integrou corretamente no locus do gene TOPO3, então uma PCR usando iniciadores de genes ou regiões externas a cada construção deverá apresentar amplificação positiva.

Após a confirmação da correta inserção dos cassetes no genoma de *T. cruzi*, iniciamos as clonagens para a construção do cassete para a deleção do segundo alelo das populações de *T. cruzi*^{TOP3 α /^top3 α ::neo} e *T. cruzi*^{TOP3 β /^top3 β ::neo}.

3.5.6.7.1 - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE HIGRO

O gene higo foi amplificado usando os oligonucleotídeos HIGROF e HIGROR (Quadro 1) a partir do plasmídeo pNUS (TEATAUD *et al.*, 2002) em uma reação de PCR contendo 10 ng do plasmídeo pNUS, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão 1x, 2,5 unidades de Taq Platinum high fidelity DNA polimerase (Invitrogen). Os reagentes foram misturados e aquecidos por 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 68°C por 1 min. O gene higo foi purificado por extração com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol (2 volumes). O DNA foi lavado com etanol 70% e, depois de seco, reidratado em TE. Após essa etapa, o fragmento foi digerido com as enzimas *Hind*III e *Eco*RI conforme descrito anteriormente. Os sítios para essas enzimas estão presentes nos iniciadores HIGROF e HIGROR, respectivamente.

3.5.6.7.2 DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS pNEO2 Δ top3 (alfa e beta)

Os plasmídeos pNEO2 Δ top3 (alfa e beta) foram digeridos com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* para a remoção do gene neo. As digestões foram aplicadas em gel de agarose 0,8%. A banda referente ao plasmídeo linearizado (pNEO2 Δ top3/*HindIII/EcoRI*) foi removida do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi e purificado por eletroeluição (item 3.5.6.4).

3.5.6.8 – CLONAGEM DO GENE HIGRO

O gene hgro amplificado por PCR e digerido com *HindIII* e *EcoRI* foi ligado com o plasmídeo pNEO2 Δ top3/*HindIII/EcoRI*. Após transformação em *E. coli*, os clones positivos foram analisados por PCR de colônia para a presença do gene hgro.

3.5.6.9 - AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES 5'CDS-HYG-3'CDS

Os cassetes 5'CDS-HYG-3'CDS (alfa e beta) foram amplificados por PCR e purificados conforme descrito anteriormente para amplificação do cassete contendo o gene neo.

3.5.6.10 - TRANSFEÇÃO DOS CASSETES 5'CDS-HYG-3'CDS

Para a transfecção foram utilizadas as populações de *T. cruzi* com um dos alelos nocauteados (*T. cruzi*^{TOP3 Δ top3::neo}) e resistentes à G418. A transfecção desses parasitas foi feita utilizando o mesmo protocolo descrito para a transfecção do cassete 5'CDS-NEO-3'CDS. Foram utilizados 400 μ L da suspensão de parasitas com 10 μ g dos cassetes 5'CDS-HIGRO-3'CDS (3 α ou 3 β). Após 24 horas de cultivo a 28 °C, foram adicionados 500 μ g de G418 e 500 μ g de higromicina B. As culturas transfectadas foram mantidas em meio LIT+G418+HIGRO por 10 dias. Após este tempo, foram diluídas (1:4) em 10

mL de LIT+G418+HIGRO e incubadas por 8 dias a 28 °C. As culturas foram mantidas a 28 °C por passagens (1:10) a cada 5 a 8 dias, em LIT+G418+HIGRO, até que o controle não apresentasse crescimento. Mutantes, nos quais os dois alelos do gene *TcTOP3* (alfa ou beta) foram interrompidos pela entrada sequencial dos cassetes NEO e HYG, foram denominados com o genótipo *T. cruzi*^{^top3::neo/ ^top3::higro}.

3.5.6.11 - EXTRAÇÃO DO DNA DE *T. cruzi*

Para cultura nocaute *topo3 α* (*T. cruzi*^{^top3 α ::neo/ ^top3 α ::higro}) e para *topo3 β* (*T. cruzi*^{^top3 β ::neo/ ^top3 β ::higro}), foram utilizadas 1x 10⁸ células. A extração foi realizada conforme descrito anteriormente (item 3.5.6.6).

3.5.6.12 - ANÁLISE DA INSERÇÃO DO CASSETE HIGRO NO GENOMA DE *T. cruzi*

Para confirmação das corretas inserções dos cassetes no genoma, foram utilizados iniciadores externos aos genes de interesse em conjunto com os iniciadores do gene *higro*, usando o mesmo procedimento feito para a análise da inserção do gene *neo* (item 3.5.6.7).

3.5.6.13 - ANÁLISE DA INSERÇÃO DOS GENES NEO E HIGRO NO GENOMA DOS MUTANTES NULOS PARA TOPO3 α E TOPO3 β POR SOUTHERN BLOT

3.5.6.13.1 – SEPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE *T. cruzi* POR ELETROFORESE DE PULSOS ALTERNADOS (PFGE)

Mutantes *topo3 α* e *topo3 β* foram cultivados em meio LIT até uma densidade de 3 x 10⁷ células/mL. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x *g* por 10 min e lavadas 2 vezes com PBS. Após as lavagens, os

parasitas foram ressuspensos em 600 µL de solução de PSG e foi adicionado igual volume de solução PSA 1% aquecido a 37°C. Esta suspensão foi imediatamente aplicada no molde para produção dos blocos (2×10^7 parasitas/bloco) a serem utilizados na corrida eletroforética.

Os blocos foram tratados com solução de lise a 50°C por 50 horas e mantidos nesta solução a 4°C até o momento de uso. Cada bloco utilizado para a análise foi incubado 3 vezes com 50 mM de EDTA pH 8,0 por uma hora antes de ser aplicado em gel de agarose. Os cromossomos foram separados por eletroforese em campo pulsado em gel de agarose 1,2% em TBE 0,5 X a 10°C, usando o sistema Pulsaphor de eletroforese de campo pulsado CHEF (LKB Pharmacia).

Blocos contendo cromossomos da levedura *Hansenula wingei* (1,05 a 3,13 Mpb) foram utilizados como marcadores de massa molecular (CHEF DNA size markers- *H. wingei Chromosomes*, BIORAD). A eletroforese foi realizada em voltagem constante (100 volts) por 135 h com os seguintes tempos crescentes de pulsos (N/S, E/W): Fase 1, pulso de 90 s (30 h); fase 2, 200 s (30 h); fase 3, 350 s (25 h); fase 4, 500 s (25 h) e fase 5, 800 s (25 h). O gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado usando o sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus biotecnologia).

3.5.6.13.1 – SOUTHERN BLOT

O gel foi tratado com solução de depurinação por 15 minutos, seguido do tratamento com solução de desnaturação por 30 minutos (2 vezes) e solução de neutralização por 30 minutos (2 vezes). O DNA foi transferido para uma membrana de *nylon* por capilaridade (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando-se como veículo o tampão SSC 20X. Após a transferência, o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta com uma dose de 120 mJ/cm², usando o aparelho Spectrolinker (Spectronics corp., USA). A membrana contendo o DNA correspondente aos cromossomos de *T. cruzi* tipo selvagem e das culturas dos parasitas mutantes foi pré-hibridada em solução

de hibridação de DNA por 1 hora a 65 °C, seguido da adição de sonda marcada radioativamente com α -[P³²]-dCTP (10 μ Ci/ μ l; 3.000 Ci/mmol), preparada segundo método de *nick translation*, descrito por Rigby *et al.* (1977), utilizando-se o kit *Nick Translation Labeling Kit* (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante.

As sondas utilizadas para este ensaio foram: gene *neo*, gene *higro* e regiões internas de *TOPO3 α* de *TOPO3 β* que não estavam contidas na construção dos cassetes. Essas regiões internas foram amplificadas por PCR a partir do DNA total de *T. cruzi* Dm28c, usando os primers 3AINTF e 3AINTR, para o gene *TOPO3 α* e 3BINTF e 3BINTR para o gene *TOPO3 β* , com respectivos tamanhos de 607 pb e 993 pb.

Após a marcação, as sondas foram purificadas em colunas de Sephadex G-50 (GE) e adicionadas ao tampão de hibridação na concentração de 5×10^6 cpm/mL. As membranas foram incubadas por 16 horas a 65 °C e, em seguida, lavadas nesta temperatura duas vezes por 30 minutos com soluções de alta, média e baixa estringência. As membranas foram expostas a filme de raio-X (Hyperfilm MP, GE) na presença de tela intensificadora durante 3 dias a -70 °C.

3.5.7 - CURVA DE CRESCIMENTO DOS MUTANTES *T. cruzi*^{^top3 α ::neo/} ^{^top3 α ::higro} E *T. cruzi*^{^top3 β ::neo/}^{^top3 β ::higro}

Os mutantes nulos para *TOPO3 α* e *TOPO3 β* foram cultivados em meio LIT a partir de inóculos de 10^6 parasitas/mL. Os parasitas foram contados diariamente por 10 dias. As contagens foram realizadas em triplicata técnica (a partir da mesma cultura).

3.5.8 – ANÁLISE DO CARIÓTIPO DOS MUTANTES NULOS PARA *TOPO3 α* E *TOPO3 β*

Os cromossomos dos mutantes foram separados por eletroforese em campo pulsado em gel de agarose 1,2% em TBE 0,5 X a 10 °C, usando o

sistema Pulsaphor de eletroforese de campo pulsado CHEF (LKB Pharmacia), como descrito no item 3.5.6.13.1. O DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com os fragmentos mostrados no quadro 2 e marcados como descrito no item 3.5.6.13.2. Esses fragmentos foram cedidos pelo Dr. José Franco da Silveira, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Quadro 2 – Sondas radioativas

SONDA	ID	Tamanho do inserto	Cromossomo
Tel 7	Tc00.1047053511469.100	627 pb	16
SAT	AY520076	195 pb	Disperso por vários cromossomos
TcChr6	Tc00.1047053510889.251	472 pb	3
TcChr38	Tc00.1047053508805.20	368 pb	16

3.5.9 – EXPOSIÇÃO DOS PARASITAS AOS AGENTES GENOTÓXICOS

3.5.9.1 – TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA

T. cruzi selvagem (Dm28c) e os mutantes *topo3 α* e *topo3 β* (em fase exponencial de crescimento) foram inoculados em 2 mL de LIT (5×10^6 parasitas/mL) em placa de 6 poços, contendo hidroxiuréia (HU) nas concentrações de 10 mM, 20 mM e 30 mM. De acordo com a literatura é necessária uma concentração de (20 mM) para a sincronização de *T. cruzi* (GALANTI *et al.*, 1994). Os inóculos foram feitos em triplicata. Os parasitas foram cultivados em meio LIT+HU por 24 horas. Após esse tempo, as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril para remover a HU e inoculadas em 2 ml de LIT.

Para a análise do ciclo celular, o DNA dos parasitas foi marcado com iodeto de propídeo (IP) de acordo com protocolo descrito por Kessler *et al.*

(2013). Os parasitas (1×10^6) foram coletados por centrifugação a $2.000 \times g$ por 5 min, lavados com PBS e ressuspensos em $500 \mu\text{L}$ de PBS + $500 \mu\text{L}$ de solução de coloração (Tris-HCl 3,4 mM, IP 75 μM , NP40 0,1%, NaCl 10 mM e 700 U/L RNase A). A suspensão celular foi mantida no gelo até a quantificação por citometria de fluxo. A fluorescência foi quantificada utilizando o filtro 610/20 nm no citômetro FACS Aria II (Becton-Dickinson). Para estimativa das percentagens de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, foi utilizado o algoritmo FlowJo (The Dean-Jett-Fox).

3.5.9.2 – TRATAMENTO COM O ANTIBIÓTICO FLEOMICINA

T. cruzi selvagem (Dm28c) e o mutante *topo3 β* foram inoculados em 2 ml de LIT (10^6 parasitas/mL) em placa de 6 poços, contendo diferentes concentrações de fleomicina (0, 20, 50 e 100 mM) em triplicatas. Os parasitas foram contados diariamente durante sete dias para determinar a sensibilidade das populações ao antibiótico através de curva dose-resposta. Análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad versão 6 e a significância estatística foi baseada no valor de $P < 0,05$.

3.5.10 - CLONAGEM PARA EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Fragmentos das regiões codantes dos genes *TcTOPO3 α* (nucleotídeo 1491 ao nucleotídeo 2766) e *TcTOPO3 β* (nucleotídeo 1476 ao nucleotídeo 2535) foram clonados no vetor de expressão bacteriano pQE-30 (Qiagen). A característica desse sistema é que a proteína recombinante é expressa com seis resíduos de histidina associados à sua porção amino-terminal.

Os clones recombinantes expressando *TcTOPO3 α* e *TcTOPO3 β* foram cultivados sob agitação em 2 mL de meio de cultivo LB Luria-Bertani (contendo

50µg/mL de ampicilina a 37 °C durante 16 horas. Essas culturas foram diluídas em 20 mL de meio LB+Ampicilina e incubadas a 37 °C (200 rpm) durante 1 hora. Após esse tempo, foi adicionado 1mM de IPTG e a cultura foi incubada por mais 3 horas a 37 °C. As bactérias foram então coletadas por centrifugação a 7.000 x *g* por 10 min a 4°C, ressuspensas em solução salina (300 mM de NaCl e 50 mM de TrisHCl pH 8,0), centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em tampão de sonicação (NaCl 300 mM, TrisHCl 50 mM, pH 8,0 e Triton X-100 2%). As células foram submetidas a 4 pulsos por 15 segundos na potência 7, com intervalos de 2 minutos no gelo entre cada pulso para a lise (Homogenizador 4710 - Cole Parmer). As suspensões foram centrifugadas a 7.000 x *g* por 10 min a 4 °C.

O material sedimentado e o sobrenadante após centrifugação, juntamente com extratos protéicos totais de *E. coli* induzidos e não induzidos, foram separadas por SDS-PAGE 13%. As topoisomerases recombinantes expressas em *E. coli* foram então purificadas parcialmente a partir da obtenção dos corpúsculos de inclusão bacterianos. Para tanto, os clones recombinantes foram cultivados em 100 mL de meio de cultivo LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e induzidos como descrito anteriormente. As bactérias foram coletadas por centrifugação e sonicadas conforme descrito acima.

Amostras proteicas do material sedimentado foram ressuspensas em 3 mL de PBS 1X e 1 mL de tampão de amostra para proteínas 4X (40 mM Tris HCl pH 6,8, 1% SDS, 2,5% β-Mercaptoetanol, 6% Glicerol e 0,005% Azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e aplicadas em gel preparativo de poliacrilamida/SDS 13%. Os geis foram submetidos a uma tensão elétrica constante de 20 volts durante 16 horas. Após a eletroforese os géis foram tratados com cloreto de potássio 100 mM gelado, para revelar as bandas de proteínas. As bandas correspondentes as topoisomerases recombinantes, foram cortadas, eletroeluídas em membranas de diálise e então recolhidas para a quantificação. A quantificação das proteínas foi feita através de análise em gel SDS-PAGE 13% e marcador de peso molecular quantitativo.

3.5.10.1 - PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TcTOPO3 α e TcTOPO3 β

Grupos de oito camundongos da linhagem *SWISS* foram inoculados três vezes com cada uma das proteínas, por via intraperitoneal, com 50 μ g de proteína recombinante em intervalos de 15 dias. Na primeira inoculação o antígeno foi emulsionado com volume igual de adjuvante completo de *Freund* (Sigma) e, nas demais, com Alu-Gel (SERVA). Para esse experimento foi utilizada a autorização de número L-005/09 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Osvaldo Cruz (CEUA-Fiocruz).

3.5.10.2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TcTOPO3 α e TcTOPO3 β ATRAVÉS DA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT*

Para o preparo de extratos protéicos, parasitas na forma epimastigota foram coletados por centrifugação a 5.000 x *g* por 5 min a 4 °C, ressuspensos em PBS contendo PMSF 1 mM e centrifugados novamente nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspenso em solução salina e tampão de amostra para proteínas 4x (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, 12% glicerol, azul de bromofenol 0,012%) de forma que a concentração ficasse em 10⁶ parasitas por microlitro de extrato. Foram utilizados 10 μ L de extrato proteico (equivalente a 10⁷ parasitas) para cada aplicação no gel e as proteínas separadas em SDS-PAGE 10%. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose de acordo com protocolo descrito por Towbin (1979), que foi então incubada com solução de bloqueio para *western blot* por 30 min. Em seguida, a membrana foi incubada com o antisoro contra a proteína TcTOPO3 α ou contra a proteína TcTOPO3 β diluído (1:500) em solução de bloqueio, por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse tempo, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS contendo Tween20 0,05% e incubadas com anticorpo monoclonal contra IgG de camundongo, conjugado à enzima fosfatase alcalina. A localização das

proteínas nas membranas foi revelada através da reação com uma mistura de 33 μL de BCIP e 66 μL de NBT em 10 mL de tampão de fosfatase alcalina (TrisHCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM).

3.5.11 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Para os ensaios de imunofluorescência, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram coletadas por centrifugação a 3.000 x *g* por 3 min, seguida de lavagem e ressuspensão em PBS.

Os parasitas foram aderidos à superfície de lâminas pré-tratadas com solução de poli-L-lisina 0,1% por 20 min a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e os parasitas foram fixados com ρ -formaldeído 4%. Após lavagem com PBS, os parasitas foram então tratados com Triton X-100 a 0,5% em PBS durante 5 min a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas e incubadas com solução de bloqueio (PBS contendo BSA 1%) por 12 h a 4 °C. Após esse período, os parasitas fixados foram incubados com os soros diluídos 1:10 e 1:50 em solução de bloqueio e incubados por 1 hora a 37 °C, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 h a 37°C com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 488 (Invitrogen) (diluição de 1:600 em solução de bloqueio). Após a incubação com o anticorpo secundário, os parasitas foram incubados com o corante Hoechst 33342 por 6 min a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas e montadas com n-propil-galato. O material foi observado em microscópio óptico Nikon modelo E600, equipado para microscopia epi-fluorescente.

3.5.12 - IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTÉICOS UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram cultivadas em 100 mL de LIT a partir de inóculo de 10^6 células/mL, até a densidade de 3×10^7 células/mL

Foram utilizados 2×10^9 parasitas por experimento. Os parasitas foram lavados duas vezes com PBS, ressuspensos em tampão de lise hipotônico (KCl 10 mM, Hepes 20 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 1,5 mM), contendo PMSF 1mM e E64 10 μ M e mantidos no gelo por 10 minutos. A suspensão celular foi submetida a uma pressão de 1.000 psi utilizando bomba de cavitação (Parr Instrument Company – mod 4639) por 30 min para a lise celular. O extrato foi centrifugado a 4.000 x *g* por 10 min a 4°C. O sedimento (fração nuclear enriquecida) foi ressuspensão no volume de tampão restante no tubo após a separação das frações. Foi adicionado ½ volume de tampão contendo baixa concentração de sal (KCl 20 mM, Hepes 20 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 25%, DTT 0,5 mM, PMSF 1 mM, e E64 1 mM). Em seguida foi adicionado ½ volume de tampão contendo alta concentração de sal (KCl 1,4 M, Hepes 20 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 25%, DTT 0,5 mM, PMSF 1 mM e E64 1 mM) para a lise nuclear. O extrato foi incubado por 2 horas a 4°C sob agitação.

Foram adicionados 10 μ g/mL de DNase I ao extrato, seguida de incubação por 5 min à temperatura ambiente com agitação. O material foi posteriormente centrifugado a 20.000 x *g* por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de KCl foi ajustada para 100 mM com tampão hipotônico.

3.5.12.1 - PREPARO DAS ESFERAS MAGNÉTICAS E INCUBAÇÃO COM O EXTRATO PROTEICO

Foram utilizados 30 μ L de esferas magnéticas acopladas a anticorpo anti-IgG de camundongo (Invitrogen) por amostra. As esferas magnéticas foram lavadas com tampão isotônico (KCl 100 mM, Hepes 20 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 5 mM) e incubadas com 15 μ L de antisoro anti-TcTOPO3 α ou anti-TcTOPO3 β por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, as esferas foram lavadas com 1 mL de tampão isotônico, ressuspensas em 30 μ L de tampão isotônico e incubadas por 16 horas com o extrato proteico. Para os anticorpos

produzidos contra TcTOPO3 α e TcTOPO3 β ligados às esferas, foi utilizado extrato enriquecido em núcleo.

Após 16 h de incubação a 4 °C sob agitação, o sobrenadante foi coletado (denominado não ligado), as esferas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de tampão isotônico cada lavagem e os complexos proteicos foram eluídos com 100 μ L de glicina 200 mM, pH 2,5 por 15 min.

3.5.12.2 - PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Setenta microlitros da fração eluída foram submetidos à solubilização proteica em tampão de desnaturação. Foi utilizada uma relação de 0,3 partes de amostra para 0,6 partes de tampão de desnaturação. Em seguida foram adicionados à amostra 0,05 mM Hepes pH 8,0, 1 mM de DTT e incubados por 30 min a 24°C e 500 rpm. Após a incubação foram adicionados 5,5 mM de iodoacetamida (IAA) e incubados por 20 min a 24°C e 500 rpm.

Após a incubação as amostras foram diluídas com aproximadamente quatro volumes de Tampão ABC e adicionados de 1 μ g de tripsina para cada 50 μ g de proteína e incubados por 16 horas a 37°C.

No dia seguinte a amostra foi acidificada com 0,5% de TFA para inativação da tripsina.

Após a digestão das proteínas, as amostras foram desalinizadas em coluna C18 (originalmente em forma de discos), na qual os peptídeos em solução aquosa se ligam por hidrofobicidade e os sais são removidos desta coluna por lavagem da mesma também com solução aquosa. Para tanto, duas porções do disco foram cortadas e inseridas em uma ponteira de 200 μ L, a membrana foi ativada com 100 μ L de metanol, submetida à centrifugação de 1.000 x *g* por 6 min, em seguida foram adicionados 200 μ L de Solução A e ela foi submetida a centrifugação de 1.000 x *g* por 6 min. Esse processo foi repetido uma vez. Após ser equilibrada, a coluna foi carregada com a amostra e centrifugada conforme descrito anteriormente. Com a amostra ligada na

coluna, ela foi submetida a lavagem com 200 μL de solução A para retirar os sais e resíduos de soluções. A eluição dos peptídeos foi feita com 20 μL de Solução B centrifugado a 1.000 x g por 1 min e repetido o processo com o mesmo volume. A amostra foi liofilizada em speed vac (SPD131DDA – *Thermo Scientific*) para a remoção da acetonitrila utilizada no tampão de eluição. A amostra foi ressuspensa em 11 μL de Solução A e analisada em espectrômetro de massa.

3.5.12.3. ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Foram injetados 10 μl (5 μg) de amostra no cromatógrafo nano LC da Eksigent. A separação dos peptídeos foi feita com gradiente linear de 120 min de 5 a 40% de acetonitrila em coluna analítica de 15 cm, com diâmetro interno de 75 μm e partículas de C18 de 3 μm . Os peptídeos foram ionizados por nano eletro spray e injetados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap LTQ XL (*Thermo Scientific*). O método de análise foi o seguinte: scan inicial no Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID e analisados no ion trap. Paralelamente ao MS2, foi realizado um full scan no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 90 segundos. A opção lock mass foi utilizada para obtenção de melhor acurácia – erro abaixo de 0,5 p.p.m. - de massa dos peptídeos trípticos precursores detectados por MS.

3.5.12.4 - ANÁLISE DOS DADOS DE PROTEÔMICA

Os arquivos gerados (.RAW) foram analisados pelo programa MaxQuant versão 1.4.0.8. Os parâmetros usados foram: Maximum miss-cleavage sites = 2; maximum charge state = 7; enzima tripsina/P; modo específico e os descritos no Quadro 3.

Quadro 3: Parâmetros selecionados no algoritmo MaxQuant.

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Version	1.4.0.8	Peptides used for protein quantification	Razor
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	Discard unmodified counterpart peptides	TRUE
Decoy mode	revert	Min. ratio count	2
Special AAs	KR	Site quantification	Use least modified peptide
Include contaminants	TRUE	Re-quantify	TRUE
MS/MS tol. (FTMS)	20 ppm	Use delta score	FALSE
Top MS/MS peaks per 100 Da. (FTMS)	10	iBAQ	FALSE
MS/MS deisotoping (FTMS)	TRUE	iBAQ log fit	FALSE
MS/MS tol. (ITMS)	0.5 Da	MS/MS recalibration	FALSE
Top MS/MS peaks per 100 Da. (ITMS)	8	Match between runs	TRUE
MS/MS deisotoping (ITMS)	FALSE	Matching time window [min]	1
MS/MS tol. (TOF)	0.1 Da	Alignment time window [min]	20
Top MS/MS peaks per 100 Da. (TOF)	10	Find dependent peptides	FALSE
MS/MS deisotoping (TOF)	TRUE	Fasta file	C:\Databases\3xflag.fasta;C:\Databases\TcruziEsmeraldo-LikeAnnotatedProteins_TriTrypDB-4.2.fasta;C:\Databases\TcruziNonEsmeraldo-LikeAnnotatedProteins_TriTrypDB-4.2.fasta;C:\Databases\TcruziUnassignedContigsAnnotatedProteins_TriTrypDB-4.2.fasta
MS/MS tol. (Unknown)	0.5 Da	Labeled amino acid filtering	TRUE
Top MS/MS peaks per 100 Da. (Unknown)	10	Site tables	Oxidation (M)Sites.txt
MS/MS deisotoping (Unknown)	FALSE	Cut peaks	TRUE
PSM FDR	0.01	Decoy mode	Revert
Protein FDR	0.01	Special AAs	KR
Site FDR	0.01	Include contaminants	TRUE
Use Normalized Ratios For Occupancy	TRUE	RT shift	FALSE
Min. peptide Length	7	Advanced ratios	FALSE
Min. score for unmodified peptides	0	AIF correlation	0.47
Min. score for modified peptides	40	First pass AIF correlation	0.8
Min. delta score for unmodified peptides	0	AIF topx	20
Min. delta score for modified peptides	17	AIF min mass	0
Min. unique peptides	0	AIF SIL weight	4
Min. razor peptides	1	AIF ISO weight	2
Min. peptides	1	AIF iterative	TRUE
Use only unmodified peptides and Modifications included in Acetyl	TRUE	AIF threshold FDR	0.01

protein quantification	(Protein N-term);Oxidation (M)	
------------------------	--------------------------------	--

3.5.13 – SUPER-EXPRESSÃO DE *TcTOPO3 α* E *TcTOPO3 β* EM *T. cruzi*

3.5.13.1 – AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *TcTOPO3 α* E *TcTOPO3 β* NO VETOR pNEO3xFlag

Os genes *TcTOPO3 α* e *TcTOPO3 β* foram inseridos no vetor pNEO3xFlag (FIGURA 11), construído no nosso laboratório a partir do vetor pTcGW-ProtCcarboxi (BATISTA *et al.*, 2010), que utiliza o sistema Gateway de clonagem (Invitrogen). Os vetores foram construídos utilizando-se como base o pBluescript II (Stratagene, San Diego, USA) onde foram inseridas três sequencias que codificam para regiões intergênicas. A primeira TcUIR é a região intergênica de ubiquitina, escolhida por ser pequena, participar em vários processos celulares e em todos os ciclos celulares do *T. cruzi* (BATISTA *et al.*, 2010). As outras duas regiões intergênicas ITR1 e ITR2 foram selecionadas a partir de genes de copia única no genoma e que possuem um nível de expressão pouco variável nos estágios epimastigota e tripomastigota metacíclicos avaliados por dados de proteômica e RNA (Comunicação pessoal Michel Batista).



FIGURA 11. Vetor para expressão em *T. cruzi* p3XFlag. PR – promotor ribossomal, TcUIR, ITR1 e ITR2 - regiões intergenicas, AttR1 e AttR2 – regiões para recombinação, Cm® - resistência para cloranfenicol, ccdB – gene para seleção negativa durante a clonagem, 3xFlag – três etiquetas de Flag (DYKDDDDK), Neomicina – resistência a neomicina.

Para tanto, foi necessária a clonagem dos genes no vetor de entrada do sistema Gateway pDONR_{TM}221 (FIGURA 12). Para isso é necessário que ocorra recombinação entre os sítios específicos *attB* (*attachment*), inseridos

nos produtos de PCR, e *attP* do vetor pDONR™221 dando origem aos sítios *attL*, no vetor, e *attR*, no produto intermediário. A enzima utilizada nesta reação é composta por uma integrase do bacteriófago lambda (Int) e um fator de integração ao hospedeiro de *Escherichia coli* (IHF) (*BP Clonase™ enzyme mix*).

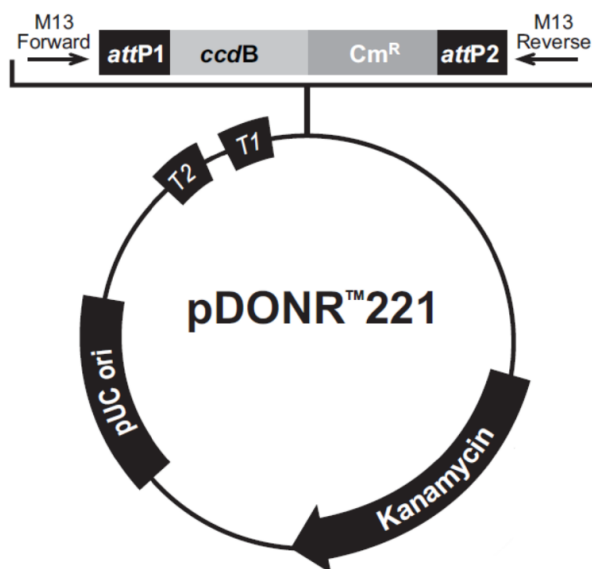


FIGURA 12 - Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen).

Os genes *TcTOPO3 α* e *TcTOPO3 β* foram amplificados utilizando os iniciadores 3AGTWF, 3AGTWR, 3BGTWF, 3BGTWR, RMIGTWF e RMIGTWR (Quadro 1). As condições desta reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 10 pmol de cada iniciador, 200 μ M de cada dNTP, 2 mM de $MgSO_4$, tampão Taq DNA polimerase 1x *High Fidelity*, 1U de Platinum Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo MWG (Biotech) com a desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridação dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 3 min. Os produtos das ampliações foram purificados utilizando o protocolo de purificação por fenol/clorofórmio.

Os genes amplificados foram inseridos no vetor pDONR™221. A reação foi feita com 150 ng dos produtos de PCR com o sítio *attB*, 150 ng do plasmídeo pDONR™221, num volume final de 9 μ L completados com TE, e 1

μL de *BP Clonase™ enzyme mix* foi incubada a 25°C por 16 horas. Após esta etapa, foi adicionado $1\mu\text{L}$ de proteinase K (2 mg/mL) e a reação foi incubada por 10 minutos a 37°C . As células cálcio-competentes *E. coli* da linhagem Top10F` foram transformados com os clones top3 em pDONR™221, conforme protocolo de transformação de células cálcio competentes (item 3.5.3). Para tanto, os $10\mu\text{L}$ da reação BP foi adicionada a $100\mu\text{L}$ de células cálcio-competentes. Após transformação, a cultura foi semeada em placa de LB/kanamicina (25 mg/mL) e incubadas a 37°C durante 16 horas.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foi feita a técnica da palitagem (item 3.5.4.1). As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo kanamicina (25 mg/mL) e incubadas por 16 horas a 37°C sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada com o kit QIAprep® *Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante.

Após esta etapa feita, foi necessário transferir os insertos para os vetores de destino pNEO3xFlag. A troca de insertos entre os vetores de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway LR clonase Enzyme mix*) e células cálcio competentes foram transformadas com os produtos das recombinações, conforme descrito anteriormente, semeadas em placas de LB contendo ampicilina ($100\mu\text{g/L}$) e incubadas a 37°C durante 16 horas.

A verificação de clones positivos foi realizada através da técnica da palitagem. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina ($100\mu\text{g/mL}$), e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.5.4.1.

3.5.13.2 – TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi* COM OS PLASMÍDEOS pNEO3xFlag/*TcTOPO3 α* E pNEO3xFlag/ *TcTOPO3 β*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram transfectadas com 10 μ g dos plasmídeos pNEO3xFlag/*TcTOPO3 α* e pNEO3xFlag/ *TcTOPO3 β* de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.6.5. Os parasitas transfectantes foram selecionados pela adição de G418 a 500 μ g/mL ao meio de cultura, 24 h após a transfecção. A seleção foi considerada positiva quando a população controle (parasitas submetidos à eletroporação sem plasmídeo) não apresentava mais proliferação no meio de cultura contendo G418 (15 a 20 dias).

3.5.13.3 – ANÁLISE DA SUPER-EXPRESSÃO DAS TOPOISOMERASES III RECOMBINANTES (*TcTOPO3-FLAG*) POR WESTERN BLOT

Extratos proteicos dos parasitas transfectantes resistentes a G418 foram preparados de acordo com o item 3.6.10.2 e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose conforme descrito no item 3.6.10.2. A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) (1:1500). Após as lavagens com PBS a membrana foi incubada com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (Sigma) (1:10.000). Os imunocomplexos foram revelados pela técnica de quimioluminescência, usando o kit ECL Western Blot (GE), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5.14 – IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEICOS

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram cultivadas em 100 mL de LIT a partir de inóculo de 10^6 células/mL até a densidade de 10^7 células/mL (3 dias). Os parasitas foram coletados por centrifugação a $6000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . As células foram lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas como descrito anteriormente e ressuspensas em 900 μL de tampão TMK (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl_2 10 mM, KCl 50 mM) contendo coquetel de inibidores de protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Roche) e E-64 10 μM . A suspensão foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 100 μL de tampão de lise 10x (TMK contendo sacarose 2M e NP40 10%) e homogeneizada gentilmente com o auxílio da micropipeta. O lisado foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 20 min a 4°C . O sobrenadante foi coletado e incubado com o anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 acoplado covalentemente a microesferas (beads) de agarose (Sigma), previamente preparada conforme orientações do fabricante. O material foi incubado por 2 h a 4°C com agitação suave. A mistura foi centrifugada a $5.000 \times g$ por 30 s para a coleta das beads. A resina foi lavada duas vezes com 0,5 mL de Tampão TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM) contendo NP-40 a 0,5% e duas vezes com 0,5 mL de TBS. A resina foi incubada por 30 min com 100 μL de uma solução de peptídeo 3xFLAG (Sigma) a 150 ng/ μL . O material foi submetido à centrifugação a $6.500 \times g$ por 30 segundos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para análise por espectrometria de massas, seguindo o procedimento descrito no item 3.5.12.2.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O protozoário *T. cruzi* e outros parasitas da Família Trypanosomatidae (Ordem Kinetoplastea), como o *T. brucei* e as diversas espécies do gênero *Leishmania* possuem ciclos de vida complexos. Esses parasitas se alternam entre hospedeiros invertebrados e vertebrados e sofrem alterações morfológicas e fisiológicas ao longo do ciclo de vida. Essas alterações estão diretamente ligadas a eventos genéticos (replicação, transcrição e recombinação) que necessitam da atividade das topoisomerases, enzimas que desempenham importantes funções na topologia e organização do DNA.

Neste trabalho nós caracterizamos dois genes que codificam as topoisomerases do tipo IA do *T. cruzi*, TOPO3 α e TOPO3 β . Em 2003, iniciamos um projeto de caracterização das topoisomerases do tipo I em *T. cruzi* clone Dm28c. Naquela época o genoma do *T. cruzi* ainda não havia sido sequenciado e a identificação das topoisomerases do tipo I deste parasita foi feita baseada na seleção de clones de bibliotecas genômica e de cDNA e amplificação dos referidos genes por PCR, usando iniciadores a partir de regiões conservadas entre as topoisomerases de diversos organismos. Através dessas técnicas fomos capazes de identificar dois genes que codificam para duas topoisomerases III (α e β), baseados na similaridade com outros eucariotos. As sequências dos genes TOPO3 de *T. cruzi* foram depositadas no banco de sequências GenBank sob os números de acesso AY850132 (*TcTOPO3 α*) e AY850133 (*TcTOPO3 β*). Com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* clone CL Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005) pudemos verificar que os genes *TcTOPO3 α* (2.766 kb) e *TcTOPO3 β* (2.559 kb) estão anotados com os números TcCLB.508851.170 e TcCLB.511589.120 para os dois alelos do gene *TcTOPO3 α* e TcCLB.510901.100 para o alelo de *TcTOPO3 β* , respectivamente.

As duas isoformas da topoisomerase III codificadas no genoma do *T. cruzi* possuem pouca identidade entre si (30 %) (Figura 13) sugerindo que possam ter funções distintas ou interagir com diferentes estruturas intermediárias de DNA. Em um ambiente celular, eventos como a replicação e

recombinação podem necessitar de diferentes topoisomerasas III com funções específicas, possivelmente atuando em diferentes fases do ciclo celular, sobre diferentes substratos. Isso pode significar que uma não pode substituir a outra em caso de perda de função. Os genes *TcTOPO3* são de cópia única, o que facilita a utilização da técnica de nocaute gênico, a fim de verificar o que acarreta para o parasita a perda de função de cada um desses genes ou de ambos os genes. A procura por domínios conservados entre as topoisomerasas III de *T. cruzi* e aquelas de outros organismos mostrou que na porção N-terminal das sequências de $TOPO3\alpha$ e $TOPO3\beta$ existe um domínio conservado em diferentes topoisomerasas, como nas topoisomerasas IA, as topoisomerasas II, as primases tipo-DnaG, as nucleases da família OLD e as proteínas de reparo da família RecR/M. Essa região foi denominada de TOPRIM (**TO**Poisomerase/**PR**IMase) (ARAVIND *et al.* 1998).


```

          *           440           *           460           *           480
TC_alfa : LSPDAVAATTAAVTAVFGEEKFTTSGTALLEKGLEWYYYERWHSTCLPA-YQQGERFVPK : 469
TC_beta  : LSPDCKLTRTKLLIEIGELESEFTGKVVEDPGEFTVLEQFAVKDDKVPTNIQVGSDEPIS : 469

          *           500           *           520           *           540
TC_alfa : DISLEKHRTTPPHLTETALIALMDEHGIGTDATIAQHIKTVLDRGYVKRE-GSFLVPTA : 528
TC_beta  : DVRLQAGQTQPPGYLTEADLIGLMEKYGIGTDASISQHVMNIVERGYCAVKPKPGRVMEPTK : 529

          *           560           *           580           *           600
TC_alfa : LGIALASAYEVIGLLSLLQPQLRAQMELAMSDIVSGKASKAQVVDAAVKLYTEVFQKLSL : 588
TC_beta  : LGVVLIHGIKSIDP-ELVLELVRSKVEEYVTCLAEGRASLDEVLSYSLDLEFGKERFPKQ : 588

          *           620           *           640           *           660
TC_alfa : GSKEMYEELCCHLSPAAPQTSGHAYGTGRIEKRRLVHCCVCKNPMDLIEQTEGERDTWC : 648
TC_beta  : NIERFDALMGASFSLS-----ALG-----KPITRCCNCMRYLLKHLEARP---QR-- : 630

          *           680           *           700           *           720
TC_alfa : VRCHTCLKDYRVPNG-RDNQLSSCGQSCILCGFGVLETRNTEKQTSYTVCPYCFTSPPPG : 707
TC_beta  : LYCAYCEVTYELPQGTIKQYSSF--KCPLDNE-ELVICHVDGGKSFPICPNCYNNPE-F : 686

          *           740           *           760           *           780
TC_alfa : TDMESFTGFRCFQLADCPLAKGIESVAIARCSACKQN--D--IRLCTGSRGAFLSCRGF : 763
TC_beta  : EDIQKQRGGRQHMACDECRHPVCYHSLATNYVADCVDERCDGCMAFVPRTSGKWKICCCNH : 746

          *           800           *           820           *           840
TC_alfa : PGCTFSVTLPWAKGVRPTPTMRCASCQAVMLQFNEG-GMPSVPGLEEGDCVCVFCDGRLQ : 822
TC_beta  : --CTMMILLEPTAQRVVSPEECSECGAMMDLQFEPECKSPLENRKDRIVACVECDPTLN : 804

          *           860           *           880           *           900
TC_alfa : DYISVKGGFTRDNDHTADREHANQQQQQQQQEHPAPYSLPSLRGREANNRSKPAKGSATC : 882
TC_beta  : ANVTEVRGRLGNFSRRGGRGGGGGGGGARGG-----RGRGGRG---GRGGSRG : 850

          *           920           *           940
TC_alfa : TLCECGVPAKQLVSRKEFSKGRFLTCAARKCSFFQWLD- : 921
TC_beta  : RY----- : 852

```

Figura 13 – Comparação entre as sequências de aminoácidos das topoisomerasas III α (Tc_alfa) e III β (Tc_beta) de *T. cruzi*. Os resíduos similares entre as duas sequências estão coloridos em preto.

A Figura 14 mostra o alinhamento entre sequências de topoisomerases do tipo IA (topo I e topo III), onde o domínio TOPRIM está selecionado (retângulo azul). O domínio TOPRIM em topoisomerases é de aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos. Como pode ser visualizado na figura 14 esse domínio apresenta pouca conservação em relação à estrutura primária das topoisomerases da subfamília IA. Entre primases apenas 10% dos resíduos do domínio TOPRIM são resíduos idênticos. Embora a sequência de aminoácidos do domínio TOPRIM seja variável entre topoisomerases e primases, sua estrutura tridimensional é extremamente conservada, como foi observado a partir da estrutura cristalográfica da primase de *E. coli* (PODOBNIK *et al.*, 2000). Acredita-se que o fato de existir um domínio conservado entre essas proteínas que possuem funções na replicação e reparo do DNA pode ser indício de um ancestral comum entre essas proteínas.

Somente três resíduos de aminoácidos são estritamente conservados em todo o domínio TOPRIM: um resíduo de ácido glutâmico (E) e dois resíduos de ácido aspártico (D) (ARAVIND *et al.*, 1998), que podem ser vistos na figura 14. A substituição do resíduo de ácido glutâmico (E) por alanina no domínio TOPRIM da topo IA de *E. coli* abole tanto a clivagem quanto a religamento das fitas, sugerindo que esse resíduo é crítico para o mecanismo de reação, possivelmente atuando como doador e receptor de prótons, doador de um próton para a hidroxila do açúcar quando da clivagem da fita e acceptor de um próton durante a reação de religamento das fitas (CHEN & WANG, 1998). Outro dado importante é que a estrutura cristalográfica da topoisomerase VI, uma topo tipo II bacteriana, apresenta um íon Mg^{+2} que está coordenado pelos três resíduos acídicos do domínio TOPRIM (NICHOLS *et al.*, 1999). Além disso, nas topoisomerases do tipo IA e do tipo II com estrutura conhecida, o resíduo de tirosina do sítio ativo, embora não faça parte do domínio TOPRIM, está posicionada próxima a este domínio durante as mudanças conformacionais que ocorrem durante o remanejamento das fitas do DNA. Esses dados sugerem que o domínio TOPRIM, através dos seus resíduos

conservados está envolvido na associação do DNA, coordenação do íon metálico e nas mudanças conformacionais do DNA (LIMA *et al.*, 1994).

Na figura 14 também está mostrado o domínio catalítico (retângulo vermelho), contendo o resíduo de tirosina conservada, baseado na estrutura tridimensional da topo I de *E. coli*. Esse domínio é bastante conservado entre as topoisomerasas da subfamília IA e é denominado de domínio TOP1Ac.

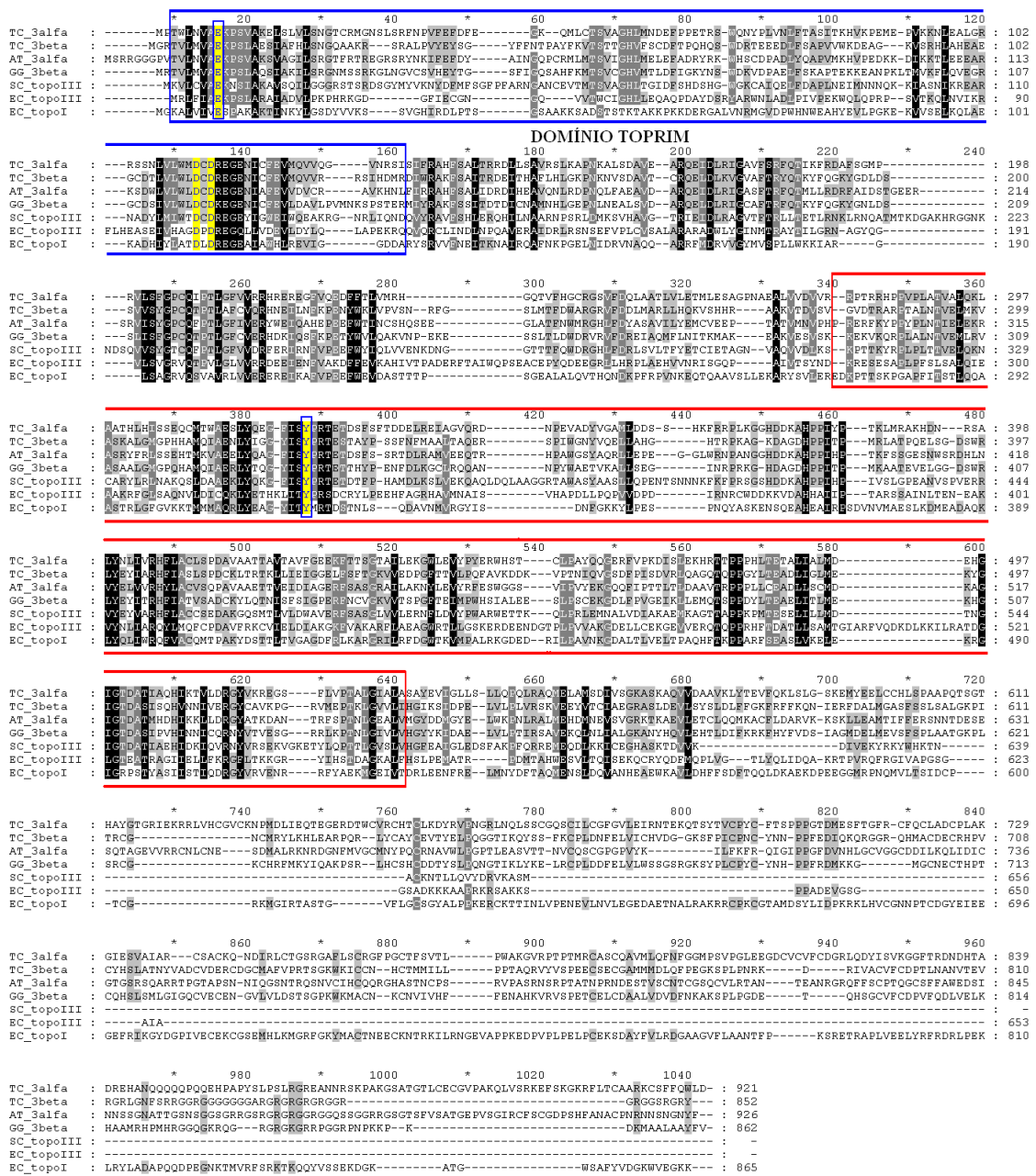


Figura 14 – Comparação entre as seqüências de topoisomerases IA: TC_3alfa – topoisomerase III alfa de *T. cruzi* (AY850132), TC_3beta – topoisomerase III beta de *T. cruzi* (AY850133), AT_3alfa – topoisomerase III alfa de *Arabidopsis thaliana* (NP_201197.1), GG_3beta – topoisomerase III beta de *Gallus gallus* (NP_001006181.1), SC_topoIII – topoisomerase III de *Saccharomyces cerevisiae* (EDN59452.1), EC_topoIII – topoisomerase III de *E. coli* (NP_416277.1), e EC_topoI – topoisomerase I de *E. coli* (NP_415790.1). A caixa azul indica o domínio TOPRIM baseado na seqüência de *E. coli*, onde pode se observar os três resíduos de aminoácidos ácidos conservados em amarelo. A caixa vermelha indica o domínio TOP1Ac conservado em todas as topoisomerases do tipo IA, que contém o resíduo de tirosina do sítio ativo (em amarelo). Os resíduos coloridos em cinza são conservados na maioria das seqüências, enquanto que aqueles em preto são resíduos conservados em todas as seqüências.

Como pode ser observado na figura 14, a topoisomerase III de *S. cerevisiae* (656 aminoácidos) é menor (~ 200 a 300 aminoácidos) do que as topoisomerasas III de *T. cruzi*, *A. thaliana*, *G. gallus* e *E. coli*. Essa diferença está localizada na porção C-terminal. Com exceção da topo III de *S. cerevisiae* as topoisomerasas III eucarióticas compartilham similaridade, embora pequena, com a topoisomerase I de *E. coli*, também uma topo da subfamília IA.

A região C-terminal da topo I de *E. coli* contém três motivos com quatro resíduos de cisteínas cada um, denominados motivos de tetra-cisteínas. Esses motivos são implicados na ligação de três átomos de zinco e são necessários para a atividade de remoção de super-hélices negativas do DNA (relaxamento) pela enzima (AHUMADA & TSE-DINH, 2002; TSE-DINH & BERAN-STEED, 1988). Esses três motivos de ligação ao zinco juntamente com o restante da região C-terminal, formam o domínio ZD, que tem grande afinidade por DNA de fita simples, sugerindo que essa região é importante na movimentação da fita simples do DNA manipulada pela topo I. Como mostrado nas figuras 15 e 16, tanto a TcTOPO3 α quanto a TcTOPO3 β possuem motivos de ligação ao zinco que se assemelham aqueles da topo I de *E. coli*. De fato, dois dos três motivos tetra-cisteína da topo I de *E. coli* podem ser alinhados com motivos semelhantes na TcTOPO3 α (cisteínas em amarelo). Outros dois motivos de tetra-cisteínas foram identificados apenas na TcTOPO3 α (cisteínas em azul). Podemos observar também a presença de um outro motivo de ligação ao zinco na porção final da região C-terminal da TcTOPO3 α sem a característica disposição dos resíduos de cisteína encontrados na topo I de *E. coli*, e que foi identificado usando o programa CDART www.ncbi.nlm.nih.gov. Esse motivo é conhecido com “GRF zinc finger” e é também encontrado em uma grande variedade de proteínas que se ligam ao DNA. O nome GRF é devido à presença dos resíduos de aminoácidos G, R e F na região central desse motivo.

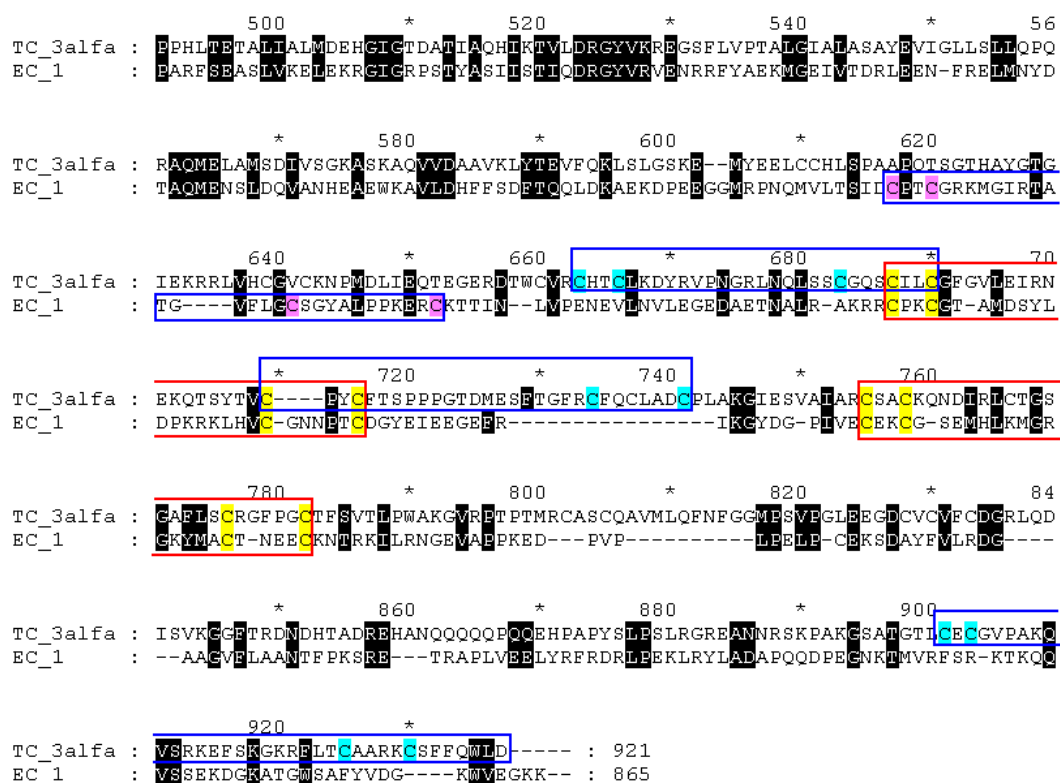


Figura 15 – Comparação das regiões C-terminal da topoisomerase III alfa de *T. cruzi* (TC_3alfa) (AY850132) e topoisomerase I de *E. coli* (EC_1) (NP_415790.1). As caixas indicam os motivos de tetra-cisteínas de ligação ao zinco. As caixas com os resíduos de cisteína marcados em rosa ou amarelo são aqueles identificados na topoisomerase I de *E. coli*. As caixas com resíduos de cisteínas marcados em azul ou amarelo são prováveis motivos de ligação ao zinco da topoisomerase de *T. cruzi*, similares àqueles domínios de *E. coli*. Os números de acesso no GenBank estão entre parênteses.

Em relação a TcTOPO3 β , apenas um dos motivos de tetra-cisteínas da topo I de *E. coli* (Zn3) pode ser alinhado (figura 16) (cisteínas em amarelo) e não identificamos outra região que apresentasse a mesma disposição dos resíduos de cisteína.

Interessante observar que a porção final da região C-terminal da TcTOPO3 β apresenta uma região rica em resíduos de glicina e arginina (Figura 16), que tem sido implicada na interação com outras proteínas e ácidos

	*	900	*	920	*	940	*	
<i>T. cruzi</i>	:	TLNSNVTEVRGRLGNFSRRGG	GRGGGGGG	ARGRGRGRGRGRGRGGSRGRY				: 852
<i>Tc.marinkellei</i>	:	TLNSNVTEVRGRLGNFSRRGG	GRGGGGGG	GGARGRGRGRGRGRGGSRGRY				: 851
<i>T. brucei</i>	:	ALSNNVSEVRGKLGNFSSRRGG	GGGKGRGRG	GRGRGRGRGYRN	~~~~~			: 841
<i>T. congolense</i>	:	VLSANVSEVRGRLGNFSRRGG	GRGR	GRGGGRGRGRKH	~~~~~			: 838
<i>L. major</i>	:	GLSPLCEEVRGRIGNFRRI	GGAAA	GGRGGRG	GRGRGRG	RGRGNREDRR		: 866
<i>L. donovani</i>	:	GLSPLCEEVRGRIGNFRRI	GGAAA	GGRGGRGRGRGRG		RGRGNREDRR		: 867
<i>L. mexicana</i>	:	GLSPLCEEVRGRIGNFRRI	GGAAA	GGRGGRG	GRGRGRG	RGRGNREDRR		: 866
<i>L. infantum</i>	:	GLSPLCEEVRGRIGNFRRI	GGAAA	GGRGGRGRGRGRG		RGRGNREDRR		: 867
<i>L. guayanensis</i>	:	GLSPLCEEVRGRVGNFRRI	GGAAA	GGRGGRG	GRGRGRG	RGRGNREDRW		: 866
<i>H. sapiens</i>	:	VFQELVELKHAASCHPMHRC	GPGRRC	GRG	-----	RGRARRPPGKPN	-----	PRRPF
<i>X. laevis</i>	:	VFQDLVELKHATMKHPMHK	GGQGRRC	GRG	-----	RGR	-----	GRRPN
<i>A. thaliana</i>	:	LLLSLVEVKHGR	--SFVRR	GRGRGRGRG	-----	RGRGRRGSKSVD	PKMSFRDF	~~~~~
<i>D. melanogaster</i>	:	DFSHLVEKHRAVASRPVRS	GGGFRGGKA	RRGGGGMGGAA	FGSGGAVTAGGGPN	AGGGVRSRVAK	DKMQQLASYFV	~~~~~
<i>G. gallus</i>	:	VFQDLVELKHAAMRHPM	HRCGQGRRC	GRG	-----	RGKGRRPPGGRPN	-----	PKKPK

Figura 17 - Alinhamento entre as regiões C-terminal das topoisomerasas

III β . As topoisomerasas III β de tripanosomatídeos estão contidas no retângulo.

Números de acesso GenBank: *T. cruzi* (AY850133), *T. cruzi marinkellei* (EKF38435.1), *T. brucei* (XP_828982.1), *T. congolense* (CCC95488.1), *L. major* (XP_001684460.1), *L. donovani* (XP_003862289.1), *L. mexicana* (XP_003877019.1), *L. infantum* (XP_001470217.1), *L. guayanensis* (CCM24996.1), *H. sapiens* (AAH02432.1), *X. laevis* (NP_001082554.1), *A. Thaliana* (NP_180760.2), *D. melanogaster* (AAD13219.1), *G. gallus* (NP_001006181.1).

4.1 - NOCAUTE GÊNICO

Os genes *TcTOPO3 α* e *TcTOPO3 β* foram inativados pela inserção, nas suas regiões codificantes, de marcadores conferindo resistência aos antibióticos G418 (gene neo) e higromicina B (gene higo). Para tanto, clonamos os fragmentos codificando a porção amino (5'CDS3) e carboxi (3'CDS3) dos genes *TcTOPO3* (Quadro 4) no vetor pNEO2, gerando os plasmídeos pNEO2 Δ top3 respectivos (Figura 18).

Quadro 4 - Tamanho dos fragmentos clonados para a geração dos nocautes

GENE	5`CDS (pb)	3`CDS (pb)
TOPO3 α	334	356
TOPO3 β	527	462

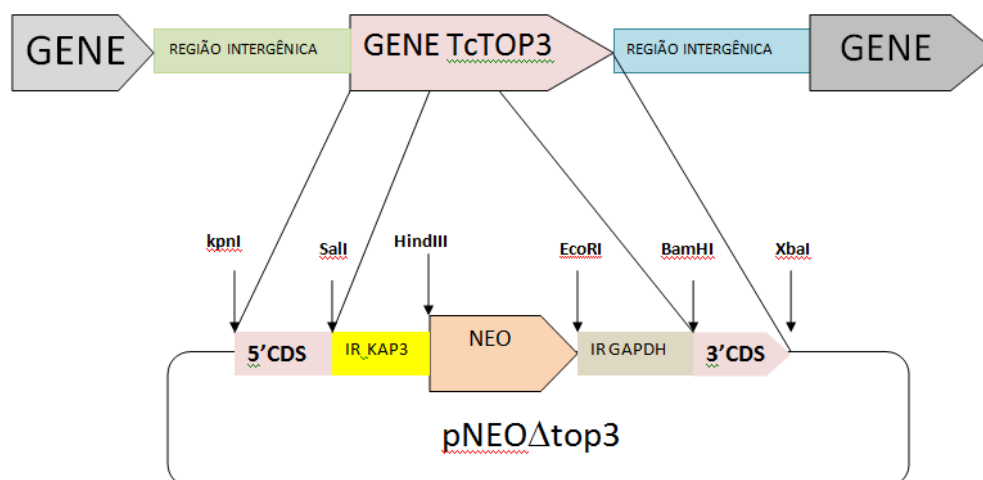


FIGURA 18. Diagrama do plasmídeo pNEO2Δtop3 utilizado para nocaute dos genes *TOPO3* de *T. cruzi*. Em amarelo e cinza estão mostradas as regiões intergênicas não reguladas em *T. cruzi*, que contém sinais para o correto processamento do transcrito do gene neo (800 pb) em *T. cruzi*. Os fragmentos 5'CDS e 3'CDS se referem as partes da região codante do gene top3 (alfa ou beta) usadas para permitir a recombinação homóloga e a inativação do gene no genoma do *T. cruzi*. IRkap3, se refere a região entre os genes (IR, *intergenic region*) da enolase e da proteína KAP3 (350 pb) de *T. cruzi* (Souza *et al.*, 2010), enquanto que IRgapdh (500 pb) é a região compreendida entre as duas cópias do gene *GAPDH* de *T. cruzi* (Kelly *et al.*, 1992).

As clonagens dos fragmentos 5'CDS3α e 3'CDS3α ou 5'CDS3β e 3'CDSβ foram analisadas por PCR, utilizando as combinações de iniciadores conforme indicado pelas setas na figura 19.

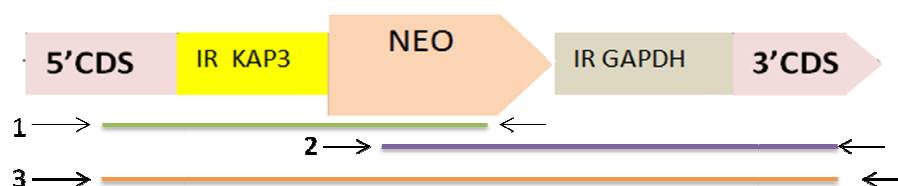


FIGURA 19. Esquema de amplificação utilizado para avaliação das clonagens em pNEO 2. As combinações de iniciadores foram: 1) TOP3KPN + NEOR; 2) NEOF + TOP3XBA; 3) TOP3KPN + TOP3XBA.

A transfecção do *T. cruzi* é normalmente feita utilizando o plasmídeo recombinante, neste caso o plasmídeo pNEO2Δtop3 linearizado ou mesmo circular. Contudo, em algumas situações observou-se que regiões do

plasmídeo, fora da construção dos cassetes, haviam se inserido no genoma, ou mesmo o plasmídeo se mantinha estável, sem integração, mas com replicação como epissomo. Portanto, para evitar tais eventos, a transfecção foi feita apenas com o fragmento compreendendo as regiões 5'CDS, a IR kap3 (350 pb), o gene neo (800 pb), a IRgapdh (500 pb) e a 3'CDS. Esse fragmento foi denominado de cassete 5'CDS-NEO-3'CDS.

O vetor pNEO2 é modular, no sentido de que o gene de seleção neo pode ser substituído por outros genes de seleção sem a necessidade de clonar novamente as regiões de recombinação (neste caso os fragmentos 5'CDS e 3'CDS). Desse modo, os plasmídeos pNEO2 Δ top3 (alfa e beta) foram digeridos com as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*RI para remoção do gene neo e a inserção do gene higo nos mesmos sítios, facilitando desta maneira a construção dos vetores pHYG2 Δ top3 (alfa e beta) (figura 20).

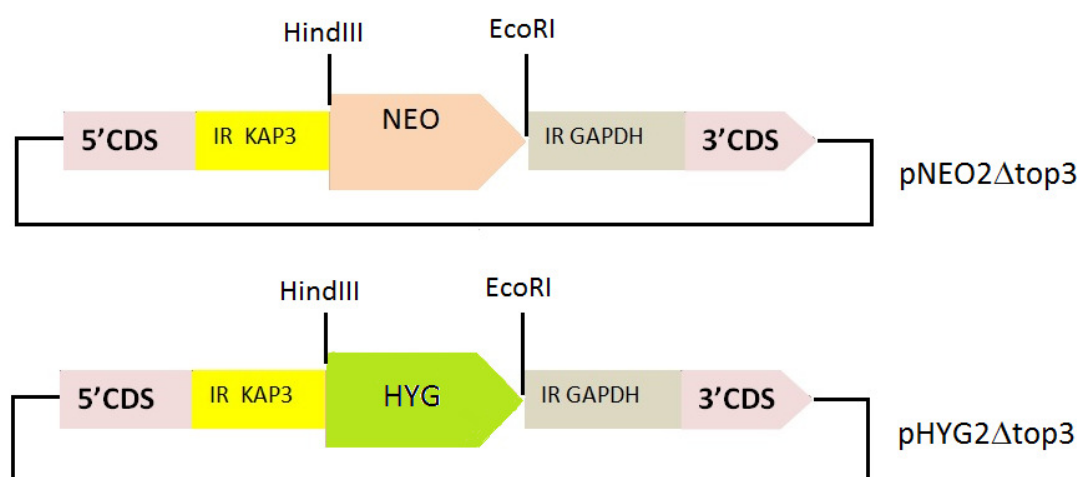


Figura 20. Desenho esquemático demonstrando o vetor pNEO2. Onde pode ser retirada a sequência de NEO e inserida a de Higo, como novo marcador de seleção.

Após a obtenção das populações resistentes ao antibiótico G418 partimos para a extração de DNA dos parasitas transfectantes para a confirmação da inserção dos cassetes nos *loci* corretos. Para isso, foram realizadas reações de PCR com iniciadores externos a cada construção

transfectada e os iniciadores dos genes de resistência. Para a população *T. cruzi topo3α* G418-resistente foi usada a combinação do iniciador EXT3AR, localizado a 434 pb a jusante do gene *TOPO3α*, e o iniciador NEOF, localizado dentro da construção, cuja amplificação deve gerar um fragmento de 2.090 pb, caso a integração tenha ocorrido no locus correto. Da mesma maneira, a reação de PCR para a população *T. cruzi topo3β* G418-resistente, usando os iniciadores EXT3BF, localizado 674 pb a montante do gene *TOPO3β*, e o iniciador NEOR, que deve gerar um fragmento de 2.351 pb. De fato, fragmentos de PCR compatíveis com os tamanhos esperados foram identificados na análise das reações de PCR em gel de agarose (figura 21). Além disso, fizemos reações de PCR com os iniciadores que amplificam os cassetes inteiros (TOP3AKPN + TOP3AXBA, no caso do gene *TOPO3α*, e TOP3BKPN + TOP3BXBA, no caso do gene *TOPO3β*), cujos tamanhos observados em gel de agarose foram compatíveis com aqueles esperados (2.315 pb e 2.604 pb, respectivamente para *topo3α* e *topo3β* (figura 21). Também foi possível observar no gel de agarose (figura 21, canaleta 3) a banda de DNA correspondente à amplificação do alelo selvagem do gene *TOPO3α* na população G418-resistente, na reação de PCR com os iniciadores TOP3AKPN e TOP3AXBA, como esperado para o nocaute de um alelo apenas. Para o gene *TOPO3β* na população *T. cruzi* G418-resistente isso não foi observado porque o tamanho do cassete foi praticamente igual ao tamanho que foi removido da região codificante do gene *TOPO3β*. Uma vez confirmada correta integração dos cassetes nos loci específicos, as populações foram denominadas *T. cruzi* $TOPO3\alpha/\wedge topo3\alpha::neo$ e *T. cruzi* $TOPO3\beta/\wedge topo3\beta::neo$, para indicar que um dos alelos do gene em questão é o selvagem e o outro foi inativado por inserção do marcador neo, conforme nomenclatura proposta por Clayton *et al.* (1998). Para simplificarmos, usaremos os termos $topo3\alpha^{+/-}$ e $topo3\beta^{+/-}$ para nos referirmos as populações de *T. cruzi* com essas marcas genéticas.

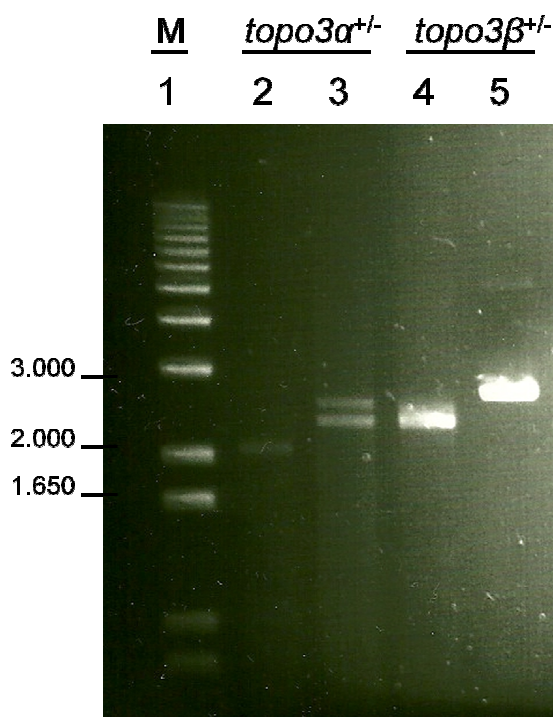


Figura 21 - Análise da integração dos cassetes 5`CDS-NEO-3`CDS nas populações dos parasitas G418-resistentes. 1 – Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen), 2 e 3 - *T. cruzi topo3α^{+/-}*, 4 e 5 - *T. cruzi topo3β^{+/-}*. Os oligonucleotídeos utilizados foram: NEOF + EXT3AR (2), TOP3AKPN + TOP3AXBA (3), NEOR + EXT3BF (4), TOP3BKPN + TOP3BXBA (5).

Após a comprovação da correta inserção dos cassetes nos loci correspondentes no genoma de *T. cruzi*, foi realizada uma nova transfecção, pois conforme mencionado anteriormente o genoma de *T. cruzi* é diplóide e é necessário garantir que os dois alelos do gene sejam substituídos no genoma. Nesta nova transfecção, os cassetes transfectados de *TOPO3α* e *TOPO3β* continham o gene que codifica para resistência a higromicina. Foram utilizadas na transfecção as populações de parasitas G418-resistentes (*topo3α^{+/-}* e *topo3β^{+/-}*).

Após a seleção dos parasitas resistentes aos dois antibióticos (G418 e higromicina B), seguimos com a extração de DNA para a confirmação da inserção dos cassetes no *loci* corretos por PCR. Do mesmo modo que para as populações G418-resistentes, reações de PCR foram feitas com um iniciador

externo à construção transfectada (EXT3AR e EXT3BF) e os iniciadores dos dois genes de resistência adequados. Os perfis eletroforéticos da figura 22 (canaletas 2 e 3) e da figura 23 (canaletas 2 e 3) mostram que os fragmentos observados são compatíveis com os tamanhos esperados para cada amplificação, sugerindo que os cassetes NEO e HIGRO se integram corretamente nos loci *TOPO3* correspondentes. Analisamos também se, eventualmente, iniciadores construídos para a porção da região codificante que foi deletada pela inserção dos cassetes seriam capazes de amplificar fragmentos correspondentes no genoma dos parasitas nocauteados, o que indicaria a presença de outras cópias dos genes em questão. Esses iniciadores foram denominados de INTF e INTR (internos, 3A e 3B) e só devem amplificar o DNA do parasita selvagem (WT, *wild type*). De fato, as figuras 22 (canaleta 5) e 23 (canaleta 5) mostram que apenas ocorreu amplificação com os primers INT quando usamos o DNA do parasita WT.

Após a confirmação da inserção dos cassetes em ambos os alelos dos genes *TOPO3 α* e *TOPO3 β* , os parasitas mutantes com essas marcas genéticas foram denominados, respectivamente, *T. cruzi*^{*^topo3 α ::neo/^topo3 α ::higro*} e *T. cruzi*^{*^topo3 β ::neo/^topo3 β ::higro*}, ou por simplificação, *topo3 α* ^{-/-} e *topo3 β* ^{-/-}.

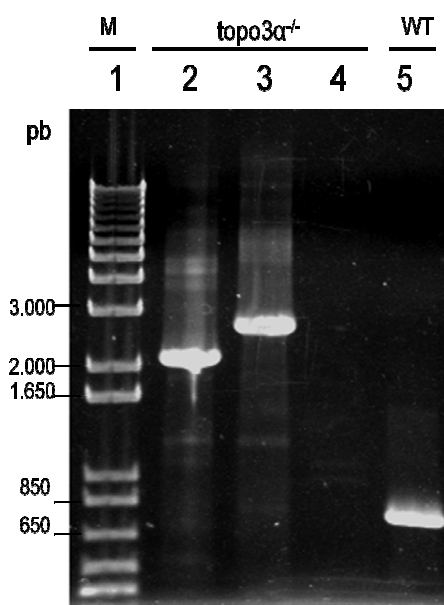


Figura 22 - *T. cruzi* mutante para *TOPO3 α* - Análise da integração dos cassetes 5`CDS-NEO-3`CDS e 5`CDS-HIGRO-3`CDS nas populações dos parasitas resistentes a G418 e higromicina. 1 – Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen), 2, 3 e 4 - *T. cruzi* topo3 α^{-} , 5 - *T. cruzi* selvagem (WT). Os oligonucleotídeos utilizados na PCR foram: NEOF + EXT3AR (2), HIGROF + EXT3AR (3), INT3AF + INT3AR (4, 5).

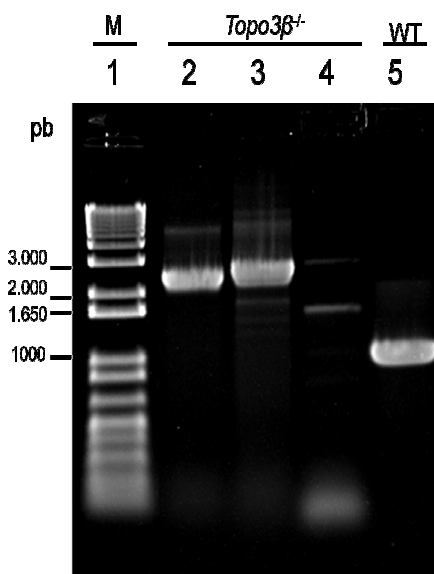


Figura 23 - *T. cruzi* mutante para *TOPO3 β* - Análise da integração dos cassetes 5`CDS-NEO-3`CDS e 5`CDS-HIGRO-3`CDS nas populações dos parasitas resistentes a G418 e higromicina. 1 – Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen), 2, 3 e 4 - *T. cruzi* topo3 β^{-} , 5 - *T. cruzi* selvagem (WT). Os oligonucleotídeos utilizados na PCR foram: EXT3BF + NEOR (2), EXT3BF + HIGROR (3), INT3BF + INT3BR (4, 5).

Após a obtenção dos mutantes individuais *topo3 α ^{-/-}* e *topo3 β ^{-/-}*, iniciamos então a obtenção de uma população mutante para ambas as TOPO3, ou duplo nocaute (*topo3 α ^{-/-}/topo3 β ^{-/-}*). A idéia era verificar se o parasita seria capaz de sobreviver sem as duas enzimas e quais as consequências disso na estabilidade do genoma. Para obter o duplo nocaute, utilizamos a população *topo3 β ^{-/-}* selecionada e, a partir dela, pretendemos inativar os alelos do gene *TOPO3 α* . Consequentemente precisaríamos de cassetes com as regiões 5' CDS3 α e 3' CDS3 α de *TOPO3 α* flanqueando outras duas marcas de resistência, uma vez que população *topo3 β ^{-/-}* já carregava as marcas neo e higo. Escolhemos então os genes *bsd* que codifica a enzima blasticidina S desaminase e confere resistência a blasticidina (blast), e o gene *pac* que codifica a enzima puromicina N- acetiltransferase e confere resistência a puromicina (puro).

A obtenção do mutante *T. cruzi*^{*TOPO3 α ^{-/-}topo3 α ::blast*} iniciou-se com a transfecção do cassete 5' CDS-BLAST-3' CDS nos parasitas *topo3 β ^{-/-}*. O cassete 5' CDS-BLAST-3' CDS foi gerado pela substituição do gene de resistência neo pelo gene blast no vetor pNEO2 Δ top3 α , que contem as regiões 5' CDS e 3' CDS do gene *TOPO3 α* .

Após a seleção da população, extraímos o DNA dos parasitas resistentes e amplificamos os fragmentos por PCR para confirmação da inserção do cassete contendo o gene blast no locus do gene *TOPO3 α* no genoma dos parasitas *topo3 β ^{-/-}*. Para tanto, fizemos a reação de PCR usando o iniciador externo à construção EXT3AR com o iniciador BLASTF, cuja amplificação resultou em um fragmento de tamanho compatível com o tamanho esperado de 1951 pb caso a integração do cassete estivesse correta (figura 24, canaleta 1).

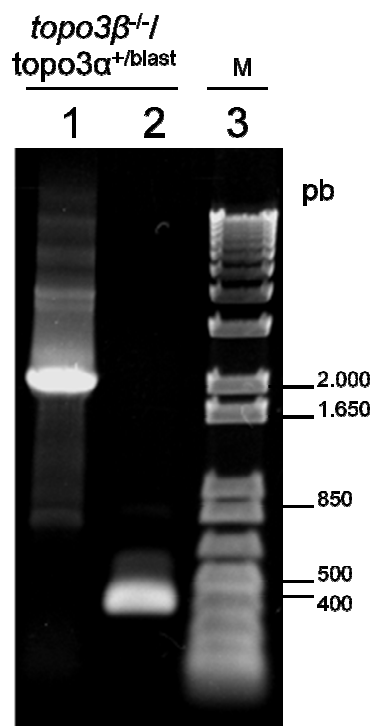


Figura 24. *T. cruzi* mutante para *TOPO3α* - Análise da integração do cassete 5`CDS3α-BLAST-3`CDS3α na população *topo3β^{-/-}* resistente a G418, higromicina e blasticidina. 1 e 2 – *T. cruzi* mutante *topo3β^{-/-}TOPO3α^{+/blast}*, 3 - Marcador de peso molecular 1 kb plus (M) (Invitrogen). Os oligonucleotídeos utilizados na PCR foram: BLASTF + EXT3AR (1), BLASTF + BLASTR (2).

A confirmação dos nocautes também se deu por ensaios de *Southern blot* a partir da separação dos cromossomos por eletroforese em campo pulsado (PFGE). Foram utilizados como sondas os genes *neo* e *higro* e fragmentos correspondentes às regiões dos genes *TOPO3α* e *TOPO3β* deletadas pela inserção dos cassetes, como já mencionado anteriormente e que foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos INT3AF+INT3AR (fragmento 3αINT) e INT3BF+INT3BR (fragmento 3βINT) (Quadro 1 e Figuras 22 e 23). Essas regiões (INT), portanto, não estão mais presentes nos parasitas mutantes nulos.

Conforme pode ser observado nas figuras 25 e 26, os padrões de hibridação das sondas são compatíveis com a inserção dos marcadores de seleção (*neo* e *higro*) nos loci gênicos *TOPO3*. Como esperado, as sondas INT

só hibridizam com os cromossomos da população de parasitas selvagens (WT) (figuras 25A e 26A), já que foram deletadas pela inserção dos cassetes NEO e HIGRO. A hidridização da sonda 3 α INT com o DNA selvagem apresenta um perfil de duas bandas. É bem possível que essa diferença de tamanho esteja relacionada a uma diferença de tamanho dos cromossomos homólogos. Segundo Souza e cols (2011), há uma variação significativa de até 50% de tamanho entre alguns cromossomos homólogos em *T. cruzi*, o que pode justificar essa diferença do tamanho das bandas observadas. Além disso, conforme observado anteriormente em nosso laboratório, há apenas uma cópia de *TOPO3 α* no clone Dm28c de *T. cruzi* (UMAKI, 2005). Corroborando esses dados, a sonda neo hibridiza com o cromossomo homólogo maior (figura 25 B), enquanto que a sonda higo hibridiza com o cromossomo homólogo menor (figura 25C).

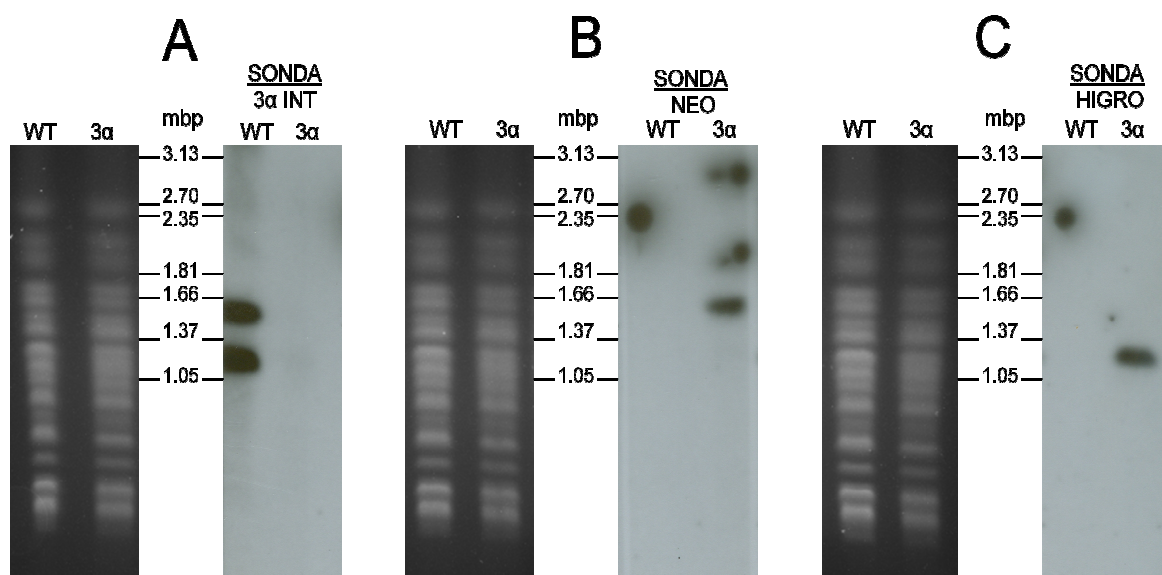


Figura 25: Ensaio de *Southern blot* a partir da separação dos cromossomos de *T. cruzi* Dm28c selvagem (WT) e mutante *topo3 α ^{-/-}* (3 α) por eletroforese em campo pulsado (PFGE). A) sonda 3 α INT, B) sonda neo, C) sonda higo. Marcador de peso molecular *H. wingei* (BioRad).

No caso do gene *TOPO3 β* , a sonda 3 β INT reconhece apenas uma banda cromossômica nos parasitas selvagens (WT), sugerindo que os dois cromossomos homólogos que contem o gene *TOPO3 β* tenham tamanhos

similares, o que reflete nos padrões de hibridação das sondas neo (figura 26B) e higo (figura 26C).

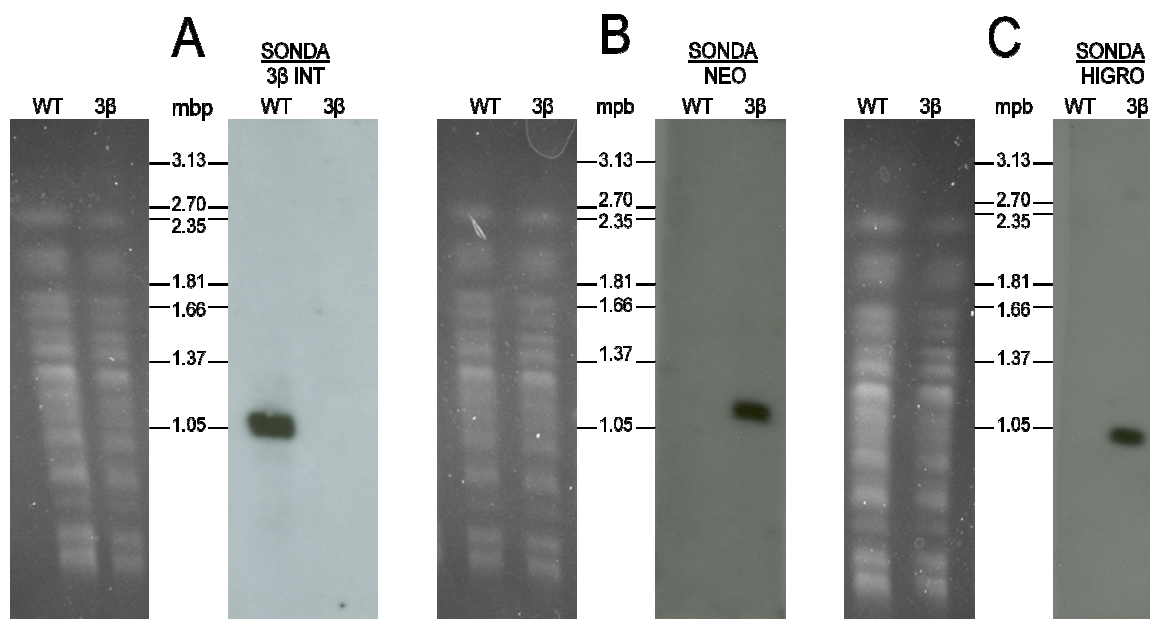


Figura 26: Ensaio de *Southern blot* a partir da separação dos cromossomos de *T. cruzi* Dm28c selvagem (WT) e mutante *topo3β*^{-/-} (3β) por eletroforese em campo pulsado (PFGE). A) sonda 3βINT, B) sonda neo, C) sonda higo. Marcador de peso molecular *H. wingei* (BioRad).

4.2 - CURVA DE CRESCIMENTO DOS PARASITAS NOCAUTES *topo3α*^{-/-} e *topo3β*^{-/-}.

A importância das topoisomerasas III é atestada pela grande variedade de fenótipos apresentados por vários mutantes para essa enzima. Tanto os mutantes *top3*- de *E. coli* (SCHOFIELD *et al.*, 1992), quanto os de *S. cerevisiae* (GANGLOFF *et al.*, 1999) tem níveis aumentados de recombinação, particularmente dentro de sequências repetidas. Esse fenótipo de recombinação nos mutantes *top3* sugere que essa enzima tenha um papel crítico na regulação do processo de recombinação, possivelmente impedindo que eventos de recombinação indesejados ocorram entre os cromossomos que estão sendo replicados ou reparados. Estudos com camundongos transgênicos mostram que, embora o nocaute do gene *TOPO3β* não seja letal, ainda assim

os camundongos apresentam uma diminuição de sua longevidade. O efeito mais severo, contudo, é quando o gene nocauteado é aquele que codifica a TOPO3 α . Nesse caso, o nocaute é letal ainda durante o desenvolvimento embrionário do camundongo (LI & WANG, 1998; KWAN & WANG, 2001). Isso demonstra que a função de uma das isoformas da topo III não pode ser completamente compensada pela outra isoforma na célula. Em *S. pombe*, diferente de *S. cerevisiae*, a deleção do gene *TOP3* é letal (GOODWIN *et al.*, 1999). O papel da topo III em eventos envolvendo a estabilidade do genoma mostra que essa enzima pode ser um importante alvo para a ação de inibidores, uma vez que as suas funções aparentemente não são totalmente assumidas por outras topoisomerases. Durante a manutenção das culturas de parasitas *topo3 α ^{-/-}* e *topo3 β ^{-/-}* em meio LIT, observamos que os parasitas *topo3 α ^{-/-}* proliferavam mais lentamente do que os parasitas selvagens e mesmo em relação aos mutantes *topo3 β ^{-/-}*, o que corrobora resultados descritos na literatura, que mostram que a ausência dessa enzima pode ser crítica para manutenção da estabilidade celular. De fato, a curva de crescimento do mutante *topo3 α ^{-/-}* (figura 27) mostra que esse mutante se prolifera mais lentamente do que o parasita selvagem. Esse resultado contrasta drasticamente com aquele obtido com os mutantes *topo3 α ^{-/-}* de *T. brucei*, que não apresentou mudança na proliferação em relação ao parasita selvagem (KIM & CROSS, 2010), o que sugere que, mesmo entre tripanosomatídeos, as topoisomerases III tenham funções distintas, se associem com complexos diferentes ou estejam envolvidas com diferentes pontos do ciclo celular.

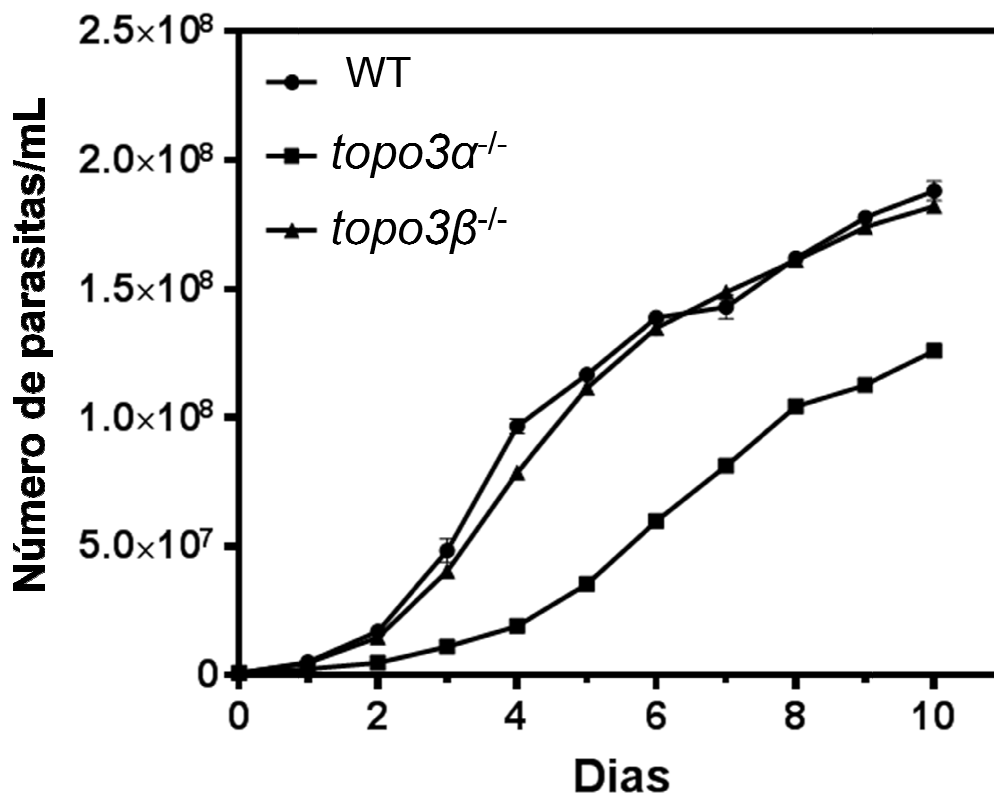


Figura 27 – Curva de crescimento *T. cruzi* Dm28c selvagem (WT) (●) e nocautes *topo3α*^{-/-} (■) e *topo3β*^{-/-} (▲). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste T e o programa GraphPad versão 6 (GraphPad software, San Diego, CA). A significância estatística foi baseada no valor de $P < 0,05$.

4.3 - EXPOSIÇÃO DOS PARASITAS AO INIBIDOR DE REPLICAÇÃO HIDROXIURÉIA

Embora nossos resultados não excluam a possibilidade das topoisomerasas III estarem atuando na manutenção dos níveis de recombinação em *T. cruzi*, não podemos também excluir a possibilidade de que elas possam estar atuando em outros processos, tais como a replicação, resolvendo intermediários gerados pela abertura das fitas. Portanto resolvemos investigar se as topoisomerasas III tem algum papel no controle do ciclo celular. Para isso, tratamos os parasitas selvagens e mutantes com hidroxiuréia (HU), a fim de sincronizar as células na fase G1 do ciclo celular. O ciclo celular

eucariótico representa um processo evolucionário conservado, envolvendo uma série de eventos moleculares ordenadas e altamente controladas. Em geral, o ciclo celular pode ser considerado tendo dois eventos distintos, replicação de DNA (fase S) e mitose (fase M) que é separada em duas fases (G1 e G2). Esses eventos devem ser regulados para garantir que eles ocorram no momento correto e apenas uma vez por ciclo celular. A divisão celular de tripanosomatídeos segue o mesmo modelo de divisão celular de células eucarióticas, com a diferença de que essas células possuem estruturas citoesqueléticas e algumas organelas que são únicas na célula, fazem parte desse grupo o núcleo, mitocôndria, cinetoplasto (DNA mitocondrial), corpúsculo basal, complexo de Golgi e flagelo. Todas essas organelas precisam estar duplicadas antes que a divisão celular ocorra (LI, 2012).

A Hidroxiuréia (HU) inibe a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, responsável por converter ribonucleosídeos-difosfato em precursores de desoxirribonucleotídeos, desse modo a síntese de DNA é inibida levando a morte das células na fase S e a sincronização das células que sobrevivem na fase G1 (WRIGHT *et al.*, 1990). Experimentos com padronização de concentrações de HU para sincronização do ciclo celular em células de mamíferos utilizam normalmente de 0,75 a 2,5 mM de HU. Galanti e cols (1994) padronizaram a sincronização do ciclo celular em *T. cruzi* e demonstraram que uma alta concentração de HU (20 mM) é necessária para esse parasita. Submetemos, portanto, as populações nocautes para TOPO3 α e TOPO3 β , bem como os parasitas selvagens a 10, 20 e 30 mM de HU por 24 horas. Após esse tempo, os parasitas foram lavados exaustivamente, para a remoção de HU do meio, e incubados novamente em LIT. O ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo após a marcação do DNA com iodeto de propídeo. Os resultados estão mostrados na figura 28. Podemos observar que em todas as concentrações de HU as populações selvagem (WT) e nocautes *topo3-* haviam sido sincronizadas em G1 (tempo 0 h após remoção HU). Quando analisamos a fase S do ciclo celular (tempo 5 h após a remoção de HU), diferenças de comportamento das populações selvagem e nocautes

começam a ser percebidas quando as concentrações de HU aumentaram para 20 e 30 mM. No tempo 5 h, com HU 20 mM foi possível perceber que parte da população selvagem não progrediu para a fase S e com HU 30 mM a população selvagem continuou em G1, diferentemente das populações nocautes. Na fase do ciclo celular G2/M (tempo 9 h após remoção HU) foi onde observamos profundas alterações no comportamento das populações selvagem e mutantes nas concentrações de 20 e 30 mM HU. Com HU 20 mM já se observava que uma grande fração dos parasitas nocaute *topo3 α* continuava na fase S (área sobre a linha azul), enquanto que as populações WT e *topo3 β* conseguiram prosseguir no ciclo celular. Com HU 30 mM, a maior parte da população WT continuou em G1, enquanto os mutantes *topo3 α* e *topo3 β* progrediram para G2/M, embora uma fração da população do mutante *topo3 α* continuou na fase S. Esses resultados sugerem que as topoisomerasas III devem ter papel importante no controle da passagem da fase G1 para a fase S (*checkpoint* G1/S) do ciclo celular, pois, na ausência dessas enzimas, os parasitas são capazes de progredir no ciclo celular mesmo que o DNA não tenha sido reparado corretamente, enquanto que na população selvagem isso não ocorre, pois as células ativam a via de sinalização de dano no DNA e reduzem a replicação do DNA.

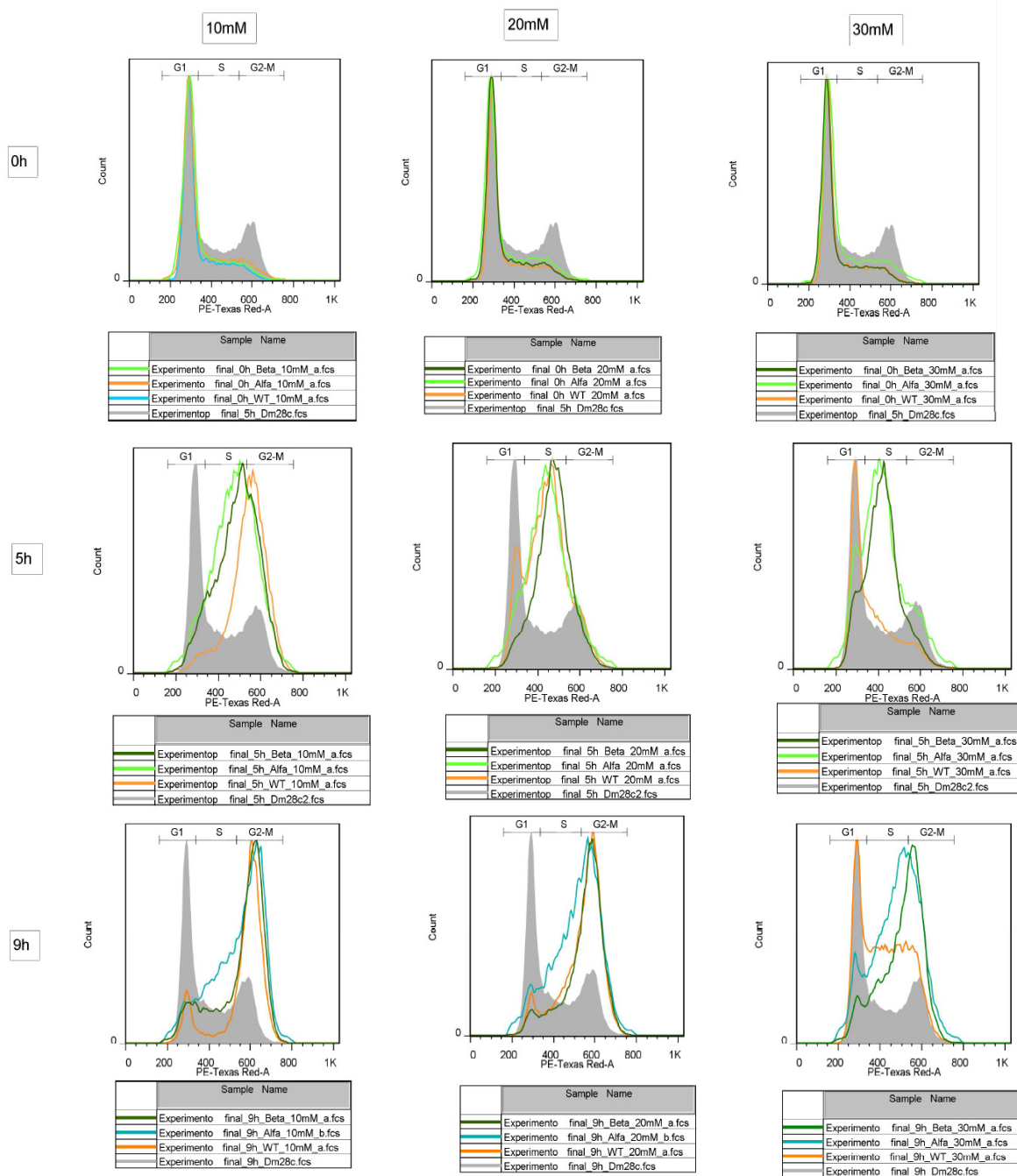


FIGURA 28 – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo de epimastigotas de *T. cruzi* sincronizadas por tratamento com hidroxíureia. As populações selvagem (WT), *topo3 α* ^{-/-} (Alfa) e *topo3 β* ^{-/-} (Beta) foram tratadas com hidroxíureia (HU) por 24 h. Os parasitas foram analisados por citometria de fluxo após marcação do DNA com iodeto de propídeo, nos tempos de 0, 5 e 9 horas após a retirada da hidroxíureia. Os quadros mostram o tempo, o nome da amostra e a concentração de HU.

A capacidade da célula de evitar mutações mantém a integridade genômica. Para isso é necessário que a célula tenha um rígido mecanismo de reparo durante a replicação para que haja a fiel reprodutibilidade da informação. Assim como a replicação, a segregação dos cromossomos envolve vias bioquímicas envolvidas com danos ao DNA. Essas vias são constantemente utilizadas pela célula para o reparo de danos causados por metabólitos gerados naturalmente pela célula além daqueles causados pelo meio em que ela se encontra. Um sistema eficiente de reparo preserva o genoma de erros, porém, algumas vezes esse sistema pode falhar, e quando a mutação envolve genes essenciais pode levar a célula a apoptose. Alternativamente, a célula pode manter suas funções biológicas com o dano causado, e por outro lado, pode causar outros danos durante o reparo. Mutações em proteínas envolvidas em reparo ou nas funções relacionadas ao *checkpoint* são danosas às células levando a instabilidade genômica, evento fortemente presente em células cancerosas (LENGAUER *et al.*, 1998).

A instabilidade genômica está envolvida em várias síndromes humanas resultantes de mutações em proteínas responsáveis da família RecQ helicases, que desempenham papel importante na interface dos processos de replicação, recombinação homóloga e reparo do DNA. Entre estas estão a Síndrome de Bloom (gene mutado BLM) e a Síndrome de Werner (WRN) (OUYANG, WOOB & ELLIS, 2008). Algumas características importantes são compartilhadas com os mutantes *top3-* de *S. cerevisiae*, tais como a instabilidade genética, trocas excessivas de cromátides irmãs e grandes deleções cromossômicas (ELLIS *et al.*, 1994; YU *et al.*, 1996; ROTHSTEIN & GANGLOFF, 1995). A relação das RecQ helicases com as topoisomerasas III reside no fato de elas formarem um complexo conhecido como sistema RTR. Este complexo consiste das proteínas **RecQ-family helicase** (**BLM** em mamíferos and **SGS1** em *S. cerevisiae*), **Topoisomerase III α** e **RMI** (*RecQ mediated genome instability*)^{1/2} (**BLAP75/18** em mamíferos e **RMI1** em *S. cerevisiae*). O complexo RTR participa da manutenção da integridade do genoma, controlando eventos como a replicação, recombinação mitótica e meiótica e a dinâmica dos telômeros. Uma

das principais funções do complexo RTR é remover estruturas intermediárias na estrutura do DNA, geradas por eventos de recombinação, que poderiam se acumular durante esses processos (revisito por MANKOURI & HICKSON, 2007). Foi observado em diversos sistemas que a topoIII interage física e funcionalmente com DNA helicases da família RecQ (BENNETT et al.; 2000, SHIMAMOTO et al.; 2000; LAURSEN et al.; 2003; AHMAD & STWART, 2005). A hipótese para explicar esse fenômeno considera que a ação da helicase gera um substrato para a topoIII. Estudos com *S. cerevisiae* mostram que os defeitos no crescimento em mutantes *top3* são devido ao acúmulo de intermediários de recombinação e esses defeitos podem ser compensados com mutações no gene *SGS1* ou na via RAD51. RMI1 de *S. cerevisiae* estimula tanto a ligação da TOP3 em fita simples de DNA, quanto estimula a atividade da enzima em relaxar DNA (WALLIS et al., 1989; GANGLOFF et al., 1994; SHOR et al., 2002; CHEN & BRILL, 2007). Foi observado que RMI1 humana parece controlar também a atividade de dissolução de junções Holliday da TOPO3 α (RAYNARD et al., 2008). Em *T. brucei* já foi observado que a TOPO3 α interage com RMI1 e essa interação é importante para controlar a recombinação dos genes VSG, já que mutantes para RMI1 tem níveis aumentados de trocas de VSGs (KIM & CROSS, 2011). Desse modo, o quadro que se delineia é que a redução na atividade ou a ausência da topoIII gera um acúmulo de intermediário de replicação ou recombinação, que não pode ser resolvido por outra topoisomerase, levando aos efeitos genéticos observados. Portanto, a incapacidade de formar o complexo RTR pode explicar a redução da viabilidade da população nocaute para TcTOPO3 α (vide curva de crescimento, figura 27), possivelmente pela incapacidade de resolver adequadamente os intermediários gerados nos processos de replicação, recombinação homóloga e reparo. Vale ressaltar que também identificamos ortólogos dos genes *SGS1* (numeros de acesso: TcCLB.507433.9 e TcCLB.507989.40) e *RMI1* (TcCLB.510091.130) em *T. cruzi*, sugerindo que o complexo RTR é conservado nessa espécie.

Já o papel da topoisomerase III β é indefinido, embora tenha sido identificada associação de topIII β de humanos com a proteína SGS1 (NG *et al.*, 1999). Nossos dados, contudo, mostram que em *T. cruzi*, topoisomerase III β juntamente com a topoisomerase III α , tem papel importante no controle do ciclo celular. Entender as associações das topoisomerasas III com outras proteínas deverá ser a próxima etapa no estudo da função dessas enzimas.

4.4 - EXPOSIÇÃO DOS PARASITAS AO AGENTE GENOTÓXICO FLEOMICINA

Fleomicina é um antibiótico isolado de *Streptomyces verticillus* que se liga e se intercala na molécula de DNA. Quebras na dupla fita de DNA são geradas pela formação de complexos reativos entre a enzima e o íon Fe⁺² na presença de oxigênio (SUZUKI *et al.*, 1970).

A maioria das células cultivadas em condições aeróbicas é sensível a fleomicina, cujas concentrações inibitórias variam de acordo com o tipo celular e as condições de pH e concentração de sais do meio de cultura. Leveduras são sensíveis a fleomicina em concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que células de mamíferos a concentração de fleomicina pode variar entre 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Doses tão pequenas quanto 0,6 $\mu\text{g/mL}$, contudo, já são suficientes para inibir a proliferação de *T. brucei* (formas procíclicas) e a viabilidade do mutante *topo3 α* é sensivelmente reduzida (10x) nessa concentração de fleomicina (KIM & CROSS, 2010), sugerindo que a TbTOPO3 α tenha papel no reparo das quebras no DNA causadas pela ação da fleomicina. Portanto, resolvemos verificar se tal efeito ocorria no mutante *topo3 β* de *T. cruzi*, visando sua utilização nos experimentos associados com a imunoprecipitação dos complexos contendo TOPO3 em condições de dano ao DNA. Formas epimastigotas das populações selvagem e nocaute *topo3 β* foram cultivadas em LIT na presença de fleomicina nas concentrações de 20, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que o *T. cruzi* é extremamente resistente ao antibiótico fleomicina, por isso usamos

concentrações bem mais elevadas do que aquelas que causam redução da viabilidade do *T. brucei*. A primeira explicação é que o sistema de reparo do *T. cruzi* é bem mais eficiente do que *T. brucei*, a segunda explicação pode residir nas condições de cultivo (composição do meio, pH, temperatura, concentração de sais), que interferem com a atividade do antibiótico e a terceira hipótese é que a droga não atravesse a membrana plasmática ou seja, é bombeada de volta por meio de um mecanismo de resistência a drogas. Vale ressaltar que esses experimentos foram realizados apenas com o mutante *topo3 β* , pois a população mutante *topo3 α* ao longo das passagens foi se tornando inviável e não conseguimos recuperar as amostras que estavam sendo mantidas guardadas em nitrogênio líquido.

Os efeitos das várias concentrações de fleomicina sobre a proliferação das populações selvagem e mutante *topo3 β* foram então determinados. Podemos observar na cultura controle (WT) que a proliferação é inversamente proporcional à concentração de fleomicina, ou seja, quanto maior a concentração de fleomicina menor é o número de parasitas/mL ao longo do tempo. A redução do crescimento é mais pronunciada a partir do quarto dia de cultivo (figura 29).

Quando analisamos o crescimento da população mutante *topo3 β* , podemos observar que esse mutante é mais resistente à fleomicina e, portanto, se prolifera mais do que a população selvagem, mesmo em concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (figura 30). Esses resultados são interessantes e aparentemente contraditórios com a função das topoisomerasas no reparo de danos no DNA. Assim, o mutante *topo3* deveria ser mais propenso aos efeitos negativos da quebra do DNA pela fleomicina. Novamente, esses resultados nos remetem aqueles do tratamento dos parasitas com HU, onde as populações mutantes alfa e beta progrediram no ciclo celular mesmo após terem sido expostas a concentrações elevadas de HU. É plausível supor que a população mutante *topo3 β* continue a se proliferar, porque mecanismos de *checkpoint* celulares estão sendo negligenciados pela ausência da TOPO3 β . Outra possibilidade é que TOPO3 α possa desempenhar as funções da TOPO3 β , embora o oposto

pode não ser verdadeiro, já que os mutantes *topo3 α* apresentam proliferação reduzida. Teremos que obter novamente o mutante *top3 α* para analisar como este se comporta frente a agentes genotóxicos. É possível que o efeito de tais agentes seja mais acentuado no mutante alfa visto que sua proliferação já é comprometida. Será interessante também a obtenção do duplo mutante alfa e beta para verificar se há efeitos sinérgicos devido a deleção de ambos os genes *TcTOPO3*. A população mutante *topo3 β* com um dos alelos de *TOPO3 α* nocauteado se mantém estável.

Iniciaremos em breve a expressão de topoisomerasas III de *T. cruzi* usando vetores que adicionam a etiqueta FLAG na porção amino-terminal das proteínas, a fim de verificar se a localização da etiqueta não está interferindo na associação das topoisomerasas com o DNA e/ou proteínas.

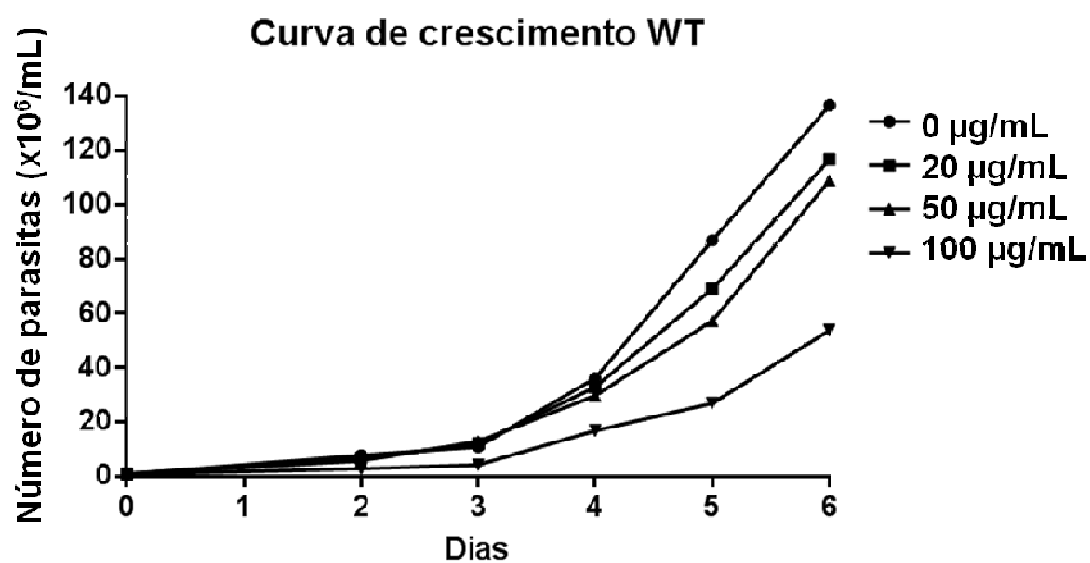


Figura 29 – Avaliação do crescimento celular de *T. cruzi* selvagem na presença de fleomicina.

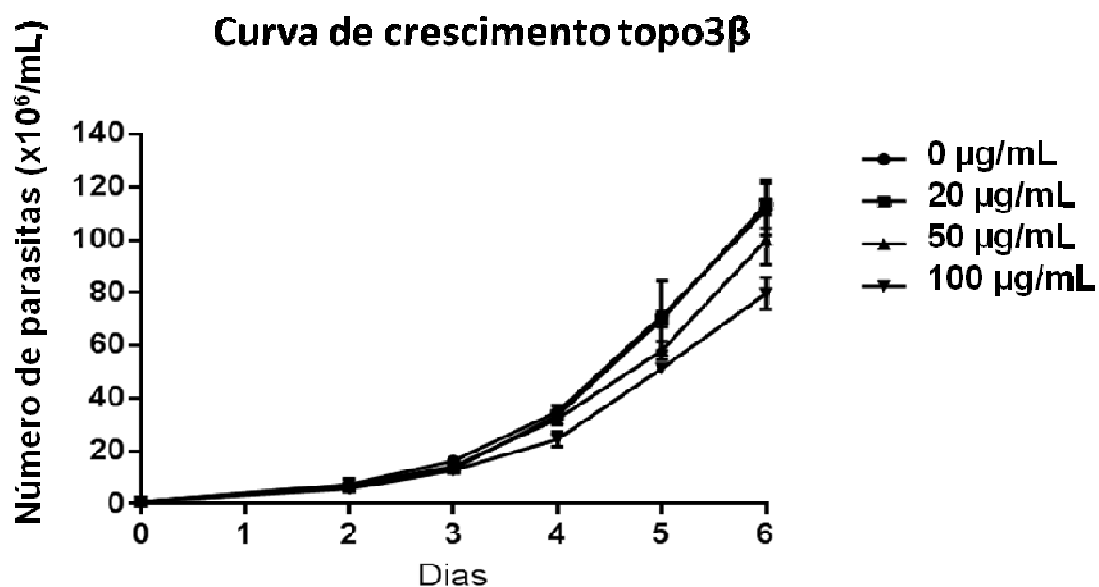


Figura 30 – Avaliação do crescimento celular de *T. cruzi* topo3 $\beta^{-/-}$ na presença de fleomicina.

4.5. - ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENOMA DOS PARASITAS *topo3 α* ⁻ e *topo3 β* ⁻ POR ELETROFORESE DE PULSOS ALTERNADOS (PFGE)

O genoma nuclear do *T. cruzi* é bastante plástico e o tamanho bem como o número de cromossomos varia entre diferentes cepas e clones desse parasita (HENRIKSSON *et al.*, 1996, SOUZA *et al.*, 2011). O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* mostrou que 50% deste constituem-se de sequências repetitivas compostas por famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e elementos sub-teloméricos. Dentre as famílias gênicas de maior representatividade no genoma do *T. cruzi* encontram-se proteínas de superfície como as trans-sialidases (TS), mucinas, proteínas de superfície associadas à mucina (MASP) e a glicoprotease de superfície gp63, que juntas perfazem 18% dos genes codificadores de proteínas, sendo que uma percentagem significativa dos membros de algumas dessas famílias (trans-sialidases e mucinas e MASPs) são pseudogenes (El-SAYED *et al.*, 2005, BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). O sequenciamento de *contigs* de *T. cruzi* mostrou que vários membros de algumas dessas famílias, tais como transialidases, DGF-1 e *Retrotransposon hot spot protein* (RHS) estão localizadas nas regiões sub-teloméricas dos cromossomos de *T. cruzi* (KIM *et al.*, 2005). Acredita-se que esses (pseudo) genes podem fornecer um *pool* adicional de variabilidade genética para a geração de novas variantes de trans-sialidases através de recombinação e conversão gênica (BUSCAGLIA *et al.*, 2006), permitindo o parasita aumentar seu repertório dessas proteínas, que são importantes para invasão celular, virulência e evasão do sistema imune do hospedeiro (GIORDANO *et al.*, 1999; WESTON, PATEL & VAN, 1999). Além disso, regiões subteloméricas parecem ser mais propensas a lesões no DNA e, conseqüentemente, alvos de mecanismos de reparo de DNA e recombinação. Portanto, é de se presumir que em um genoma com um grau de sequências repetitivas tão elevado como de *T. cruzi*, as topoisomerasas III tenham um papel fundamental na manutenção do nível de recombinação gênica pois, do contrário, poderia haver uma perigosa desestabilização do genoma, devido a

hiper-recombinação, alterando o padrão de expressão gênica e levando à inviabilidade celular.

Decidimos analisar se a ausência das topoisomerasas III em *T. cruzi* causariam grandes alterações no genoma do parasita, pelo fato dessas enzimas estarem relacionadas à manutenção da estabilidade celular, possivelmente controlando os níveis de recombinação nesse parasita. Em *T. brucei*, o nocaute do gene *TOPO3 α* produz um fenótipo descrito como hiper-rec, onde há variação no nível no qual um determinado gene *VSG* é recombinado no sítio de expressão (ES) (KIM & CROSS, 2010). Hibridizamos membranas contendo cromossomos de *T. cruzi* Dm28c selvagem (WT) e dos mutantes *topo3 α ^{-/-}* e *topo3 β ^{-/-}*, resolvidos por PFGE com diferentes sondas tanto de DNA Satélite quanto de genes ou pseudogenes situados em regiões sub-teloméricas (vide materiais e métodos, quadro 2), como descrito pelo grupo do Dr. José Franco da Silveira, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (BARROS *et al.*, 2012). Como a região sub-telomérica e DNA satélites são ricos em repetições, essas regiões podem ser alvos de processo de recombinação, cujo aumento pode ser danoso para o parasita. Assim, caso as topoisomerasas III tenham papel na manutenção dos níveis de recombinação dessas regiões, sua ausência nos mutantes *topo3* poderia gerar alterações (perda ou alteração do número de cópias, integração em outras regiões com homologia) nesses domínios genômicos, suficientemente significativas, para serem observadas no cariótipo dos parasitas mutantes, fornecendo informações sobre alterações drásticas nessas regiões. De acordo com a figura 31, as hibridizações com as diferentes sondas não mostraram alterações significativas no genoma dos parasitas mutantes em relação aos parasitas selvagens, sugerindo que pelo menos para as regiões escolhidas, a ausência das topoisomerasas III não afetou os níveis de recombinação. Será necessário, portanto, investigar mais profundamente o papel dessas enzimas no processo de controle dos eventos de recombinação de sequências repetitivas em *T. cruzi*.

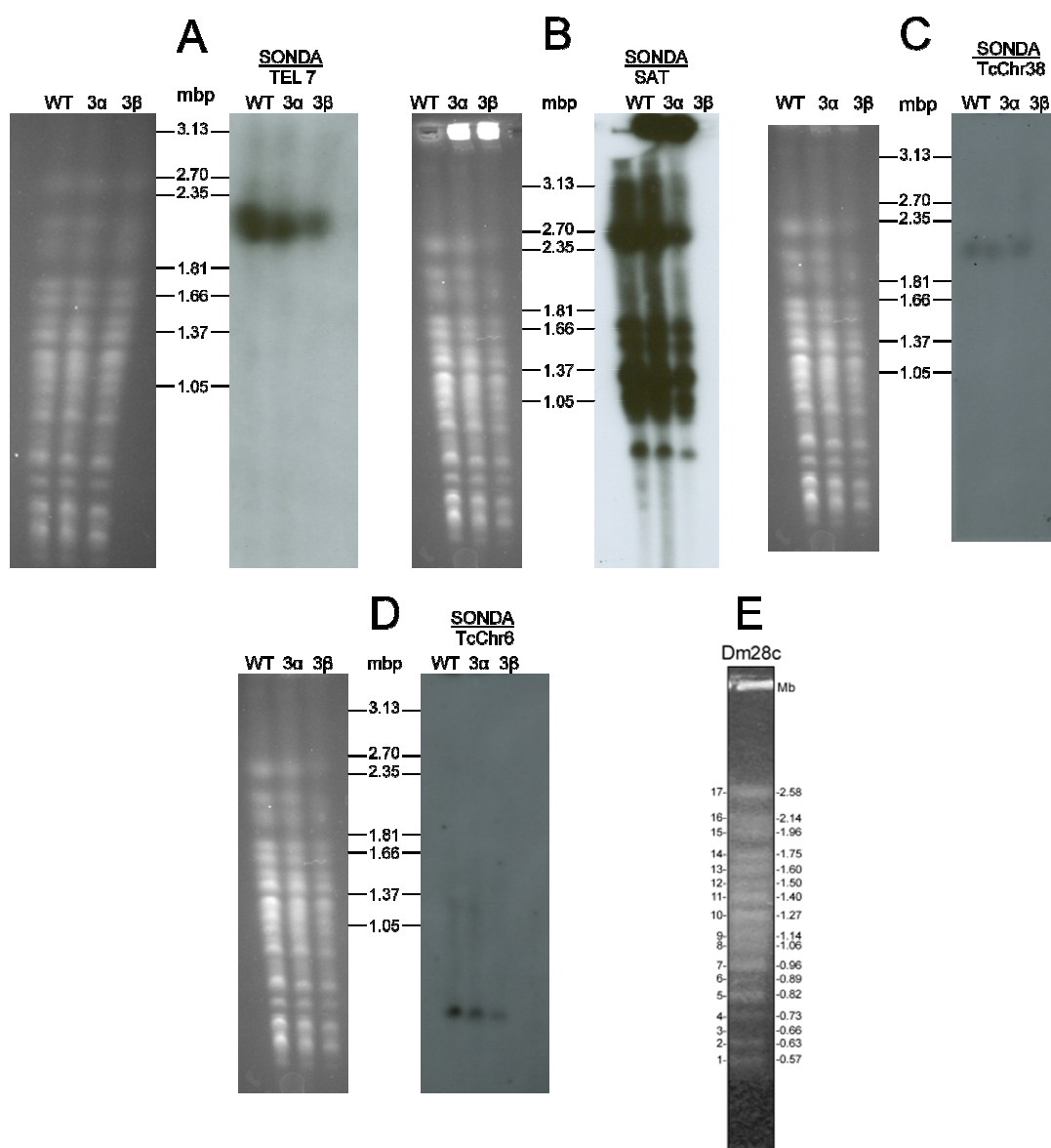


Figura 31: Ensaio de *Southern blot* utilizando sondas de regiões repetitivas. Hibridação das sondas nos cromossomos das populações selvagem (WT), nocautes *topo3α^{-/-}* (3α) e *topo3β^{-/-}* (3β) para avaliação de alterações no cariótipo. Marcador de peso molecular *H. wingei* (BioRad). A) hibridação com a sonda da região telomérica TEL7, B) hibridação com a sonda de DNA satélite SAT, C) hibridação com a sonda TcChr38, D) hibridação com a sonda TcChr6. E) o cariótipo do clone Dm28c de *T. cruzi*, mostrando a separação dos cromossomos em 17 bandas (Fonte: SOUZA *et al.*, 2011).

4.6 – IMUNOPRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

Com o propósito de identificarmos as proteínas que interagem com TOPO3 α e TOPO3 β de *T. cruzi*, expressamos ambas as topoisomerasas em *T. cruzi* utilizando o vetor para expressão pNEO3xFLAG. A expressão ectópica dos genes *TcTOPO3* a partir desse vetor leva à produção de topoisomerasas recombinantes contendo 3 etiquetas FLAG seguidas na sua porção carboxi-terminal. Isso permite que possamos analisar a expressão por *western blot* (figura 32) e imunoprecipitar os complexos usando um anticorpo monoclonal contra a etiqueta e não o antisoro contra a proteína, que nem sempre é facilmente obtido e produz resultados não muito claros ou reprodutíveis nos ensaios de imunoprecipitação.

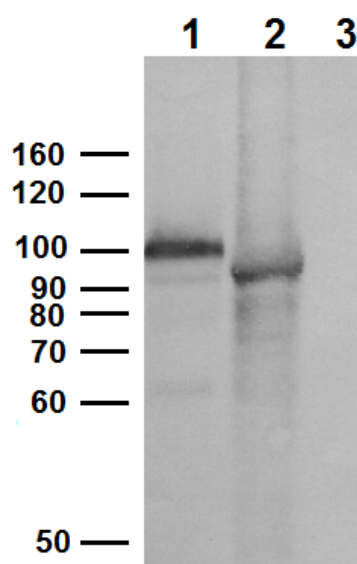


Figura 32: Análise da expressão de topoisomerasas III recombinantes em formas epimastigotas de *T. cruzi* por *western blot*, usando o anticorpo monoclonal contra a etiqueta FLAG. 1. Extrato proteico de formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando TcTOPO3 α -3XFLAG, 2. Extrato proteico de formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando TcTOPO3 β -3XFLAG, 3. Extrato proteico de formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (controle).

Extratos proteicos de *T. cruzi* expressando as topoisomerasas III em fusão com FLAG foram usados em ensaios de imunoprecipitação com o monoclonal anti-FLAG M2 ligado a beads de agarose. Como controle negativo clonamos no mesmo vetor o gene que codifica a GFP, que foi expressa também com a etiqueta 3xFLAG. A análise dos peptídeos foi realizada pelo método extracted-ion chromatogram (XIC) onde os valores gerados representam a soma das intensidades dos peptídeos. Essa intensidade é dada pela área do pico de eluição deste peptídeo. Obtivemos os resultados de três réplicas técnicas para cada Topo e GFP. Fizemos a média dos resultados obtidos nas três réplicas técnicas e utilizamos a fórmula $\text{Log}_2(\text{média topo3}/\text{média GFP})$, os resultados estão representados nas colunas $3\alpha/\text{GFP}$ e $3\beta/\text{GFP}$ das tabelas 1 e 2, respectivamente.

IDs	Proteína	PFAM	3A_Replica_1	3A_Replica_2	3A_Replica_3	GFP_Replica_1	GFP_Replica_2	GFP_Replica_3	3a/gfp	pvalor
Tc00.1047053508851.170	DNA topoisomerase III, putative		2499000	3074400	1905700	3000	3000	3000	9,70	0,0018
Tc00.1047053511589.120										
Tc00.1047053506321.290	stress-induced protein sti1, putative		422920	184630	231920	3000	3000	3000	6,54	0,0191
Tc00.1047053509047.40	hypothetical protein, conserved	DJ-1/Pfpl family	3000	335310	275600	3000	3000	3000	6,09	0,1200
Tc00.1047053511277.175	ribosomal protein S27, putative		227690	3000	227140	3000	3000	3000	5,67	0,1161
Tc00.1047053504003.60	chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit, putative		125060	3000	95738	3000	3000	3000	4,64	0,1235
Tc00.1047053510101.330	hypothetical protein, conserved	Alpha/beta hydrolase family	269390	360800	230640	3000	154020	3000	2,43	0,0211
Tc00.1047053511821.179	hypothetical protein, conserved	Myosin tail	717770	557910	446210	113780	154720	162060	2,00	0,0058
Tc00.1047053508207.70	Adenine phosphoribosyltransferase, putative		186980	166790	136870	170040	3000	3000	1,48	0,1425
Tc00.1047053509695.200	T-complex protein 1, delta subunit, putative		137920	257010	163900	83978	3000	126190	1,39	0,0873
Tc00.1047053506261.10	fatty acyl CoA synthetase 2, putative		849520	646550	504320	255810	313880	333830	1,15	0,0237
Tc00.1047053510683.20	hypothetical protein, conserved	Protein of unknown function (DUF421)	111180	103280	113940	3000	70286	77457	1,12	0,0686
Tc00.1047053510163.20	elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma), putative		232410	168350	236860	3000	100410	194160	1,10	0,1293

Tabela 1: Proteínas referentes aos peptídeos identificados na imunoprecipitação de TOPO3 α . Estão identificadas na tabela as Identidades das proteínas (IDs) de acordo com o banco de dados trytrip, a descrição de cada proteína, o resultado do banco de dados PFAM das proteínas hipotéticas, três réplicas de TOPO3 α , três réplicas de GFP, a razão entre TOPO3 α e GFP e o valor de p. Quando o valor obtido foi zero, foi atribuído o valor 3000 para fazermos os cálculos. Em sombreado estão representadas as proteínas identificadas também para TOPO3 α e TOPO3 β .

IDs	Proteína	PFAM	3B_Replica_1	3B_Replica_2	3B_Replica_3	GFP_Replica_1	GFP_Replica_2	GFP_Replica_3	3b/gfp	pvalor
Tc00.1047053510901.100	DNA topoisomerase III, putative		8998000	5717800	7711500	3000	3000	3000	11,06	0,0000
Tc00.1047053510947.20	hypothetical protein, conserved	Domain of unknown function (DUF1767)	668640	796880	620070	3000	3000	3000	6,86	0,0786
Tc00.1047053509047.40	hypothetical protein, conserved	DJ-1/Pfpl family	3000	865420	411720	3000	3000	3000	6,16	0,2225
Tc00.1047053507641.290	chaperonin HSP80, mitochondrial precursor		166790	3000	123890	3000	3000	3000	4,07	0,1932
Tc00.1047053506885.70	polyadenylate-binding protein 1, putative		263070	387850	274080	3000	87248	3000	2,97	0,1217
Tc00.1047053506261.10	fatty acyl CoA synthetase 2, putative		865680	1305600	1244600	255810	313880	333830	2,16	0,0038
Tc00.1047053509733.170	Transitional endoplasmic reticulum ATPase, putative		317440	784140	272960	220680	176450	3000	1,99	0,0061
Tc00.1047053506321.290	stress-induced protein sti1, putative		813060	3000	995190	3000	3000	3000	1,71	0,0564
Tc00.1047053510689.20	Gim5A protein, putative, glycosomal membrane protein, putative		971570	1597600	893570	358710	381560	351880	1,61	0,0011
Tc00.1047053510101.330	hypothetical protein, conserved	Alpha/beta hydrolase family	240450	369360	341150	3000	154020	3000	1,49	0,0303
Tc00.1047053509233.180	ATPase beta subunit, putative		271940	134840	189720	110580	3000	98091	1,44	0,1884
Tc00.1047053511821.179	hypothetical protein, conserved	Myosin tail	375180	448770	525310	113780	154720	162060	1,37	0,2648
Tc00.1047053507503.70	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative		272470	135030	383460	58355	94258	121380	1,25	0,3395
Tc00.1047053510683.20	hypothetical protein, conserved	Protein of unknown function (DUF421)	112860	98054	125100	3000	70286	77457	1,14	0,2257
Tc00.1047053511289.70	ADP-ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor		1170900	2525900	1061400	844500	658950	739250	1,01	0,0883
Tc00.1047053507007.99	mitochondrial carrier protein (pseudogene), putative		406490	437240	448710	146430	189300	237250	0,96	0,3809
Tc00.1047053511285.120	ATP-dependent RNA helicase, putative		132520	272980	230590	102240	85311	85231	0,95	0,4031
Tc00.1047053508207.70	Adenine phosphoribosyltransferase, putative		186480	171620	183530	170040	3000	3000	0,42	0,4677

Tabela 2: Proteínas referentes aos peptídeos identificados na imunoprecipitação de TOPO3 β . Estão identificadas na tabela as Identidades das proteínas (IDs) de acordo com o banco de dados trytrip, a descrição de cada proteína, o resultado do banco de dados PFAM das proteínas hipotéticas, três réplicas de TOPO3 β , três réplicas de GFP, a razão entre TOPO3 β e GFP e o valor de p. Quando o valor obtido foi zero, foi atribuído o valor 3000 para fazermos os cálculos. Em sombreado estão representadas as proteínas identificadas em TOPO3 α e TOPO3 β .

Para fazer os cálculos substituímos os dados que tinham zero (nenhum peptídeo identificado) por 3000 para podemos colocar os valores na fórmula, já que é necessário ter um valor maior que zero. Esse valor foi estabelecido por ser o menor valor encontrado resultante do dado.

A maioria das proteínas identificadas participa de vias metabólicas citoplasmáticas e mitocondriais. De acordo com a literatura, TOPO3 α está presente apenas no núcleo de leveduras (NORMAN-AXELSSON *et al.*, 2013). Topo3 β foi identificada no núcleo e mitocôndria de *L. donovani* (BANERJEE, SEN & MAJUMDER, 2011), dado que talvez justifique as proteínas mitocondriais imunoprecipitadas com essa proteína. Também não foi possível identificar associação da TcTOPO3 α com as proteínas ortólogas de SGS1 e RMI1, que juntas formam o complexo RTR. Uma explicação possível é que a associação dessas proteínas ocorra apenas quando há a necessidade de reparo do DNA e apenas em pontos específicos da cromatina, limitada ao tempo da sinalização e reparo do dano. Experimentos adicionais serão necessários para analisar essa hipótese, como induzir a formação de tais complexos, submetendo o parasita a agentes que danifiquem o DNA (agentes alquilantes, peróxido de hidrogênio, etc.), seguida da imunoprecipitação dos complexos associados às topoisomerases.

5 – CONCLUSÕES

- Análises *in silico* mostraram que *T. cruzi* possui duas isoformas de topoisomerase III: TcTOPO3 α e TcTOPO3 β , codificadas por genes de cópia única e com massas moleculares de 102 kDa e 95 kDa, respectivamente. TcTOPO3 α possui aproximadamente 30% de identidade com TcTOPO3 β , entretanto ambas são bastante conservadas (> 60% de identidade) nos tripanosomatídeos.
- Mutantes para TcTOPO3 α (*Tctopo3 α ^{-/-}*) e TcTOPO3 β (*Tctopo3 β ^{-/-}*) gerados a partir da inativação dos genes TOPO3, pela inserção de cassetes contendo genes de resistência aos antibióticos G418 e higromicina B. Os mutantes são viáveis, entretanto o mutante *Tctopo3 α ^{-/-}* apresenta redução no crescimento, enquanto que o mutante *Tctopo3 β ^{-/-}* se prolifera de forma similar aos parasitas selvagens, sugerindo as enzimas TOPO3 possuem diferentes funções na célula.
- Análises por citometria de fluxo mostraram que os mutantes *Tctopo3* são capazes de progredir no ciclo celular após exposição a altas concentrações de HU (30 mM), enquanto os parasitas selvagens permaneceram estagnados na fase G1, sugerindo que ambas as TOPO3 são necessárias para a resposta do DNA à danos e o bloqueio da replicação, provavelmente agindo nos pontos de verificação da fase G₁/S.
- Formas epimastigostas de *T. cruzi* são resistentes a altas concentrações de fleomicina (100 μ g/mL) e que os parasitas mutantes para *Tctopo3 β ^{-/-}* mostraram uma menor sensibilidade a fleomicina comparado com os parasitas selvagens, sugerindo que na ausência de TOPO3 β os parasitas não respondem à sinalização de danos no DNA.
- Análise do cariótipo dos mutantes *Tctopo3 α ^{-/-}* e *Tctopo3 β ^{-/-}* mostrou que o perfil de bandas cromossômicas separadas por PFGE permanece inalterado quando comparado com os parasitas selvagens.
- Análise por Southern blot a partir da hibridação com DNA satélite e genes de regiões subteloméricas de *T. cruzi*, marcados radioativamente, mostrou que não houve alterações significativas no cariótipo dos mutantes *Tctopo3* quando comparado com os parasitas selvagens.
- Análise por espectrometria de massas dos complexos obtidos a partir da imunoprecipitação das proteínas TOPO3-FLAG com o anticorpo monoclonal anti-FLAG identificou várias proteínas envolvidas em vias metabólicas citoplasmáticas e mitocondriais, sem relação aparente com os complexos contendo topoisomerase III descritos na literatura.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. E.; SHEKHTMAN, E. M.; ZECHIEDRICH, E. L. SCHMID, M. B.; COZZARELLI, N.R. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. **Cell.**, v. 71, n. 2, p. 277-88, 1992.

AGGARWAL, M.; BROSH, R. M. WRN helicase defective in the premature aging disorder Werner syndrome genetically interacts with topoisomerase 3 and restores the top3 slow growth phenotype of sgs1 top3. **Aging**, v. 1, n. 2, p. 219-33, 5, 2009.

AHMAD, F.; STEWART, E. The N-terminal region of the *Schizosaccharomyces pombe* RecQ helicase, Rqh1p, physically interacts with topoisomerase III and is required for Rqh1p function. **Mol. Genet. Genomics.**, n. 273, n. 1, p. 102–114, 2005.

AHUMADA, A.; TSE-DINH, Y-C. The role of the Zn(II) binding domain in the mechanism of *E. coli* topoisomerase I. **BMC biochem.**, v. 13, 2002.

ALAGOZ, M.; GILBERT, D. C.; EL-KHAMISY, S.; CHALMERS, A. J. DNA Repair and Resistance to Topoisomerase I Inhibitors: Mechanisms, Biomarkers and Therapeutic Targets. **Curr Med Chem.**, v. 19, n. 23, p. 3874-85, 2012.

ARAVIND, L.; LEIPE, D. D.; KOONIN, E. V. Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 26, n. 18, p. 4205-4213, 1998.

BAILLY, C. Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy. **Chem. Rev.**, v. 112, p. 3611–3640, 2012.

BAKER, N. M.; RAJAN, R.; MONDRAGON, A. Structural studies of type I topoisomerases. **Nuc Ac Res**, V. 37, n. 3, p. 693–701, 2009.

BAKSHI, R. P.; SHAPIRO, T. A. DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 3, n. 6, p. 597-608, 2003.

BAKSHI, R. P.; SHAPIRO, T. A. RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 136, n. 2, p. 249-255, 2004.

BALAHÑA-FOUCE, R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate *Leishmania major*. **BMC Microbiol.**, v. 8, n. 113, 2008.

BANERJEE, B.; SEN, N.; MAJUMDER, H.K. Identification of a Functional Type IA Topoisomerase, Ld TopIII β , from Kinetoplastid Parasite *Leishmania donovani*. **Enz Res.** v. 2011, 2011.

BARROS, R.R.M. MARINI, M.M.; ANTÔNIO, C.R.; CORTEZ, D.R.; MIYAKE, A.M.; LIMA, F.M.; RUIZ, J.C.; BARTHOLOMEU, D.C.; CHIURILLO, M.A.; RAMIREZ, J.L.; Da SILVEIRA, J.F. Anatomy and evolution of telomeric and subtelomeric regions in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v.13, n. 229, 2012.

BARTHOLOMEU, D.C.; CERQUEIRA, G.C.; LEÃO, A.C.; DA ROCHA, W.D.; PAIS, F.S.; MACEDO, C.; DJIKENG, A.; TEIXEIRA, S.M.; EL-SAYED, N.M. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res.**v.37, n. 10, p. 3407-17, 2009.

BATISTA, M.; MARCHINI, F. K. ; CELEDON, P. A. F. ; FRAGOSO, S. P. ; PROBST, C. M. ; PRETI, H. ; OZAKI, L. S. ; BUCK, G. A. ; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microb.**, v. 10, n. 259, 2010.

BELOVA, G. I.; PRASAD, R.; KOZYAVKIN, S. A.; LAKE, J. A.; WILSON, S. H.; SLESAREV, A. I. A type IB topoisomerase with DNA repair activities. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 11, p. 6015–6020, 2001.

BENNETT, R. J.; NOIROT-GROS, M. F.; WANG, J. C. Interaction between yeast sgs1 helicase and DNA topoisomerase III. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 35, p. 26898-26905, 2000.

BERGER, J. M. Structure of DNA topoisomerases. **Bioch Bioph Acta.**, v. 1400, n. 1, p. 3-18. 1998.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, n. 6, p. 1513-23, 1979.

BODLEY, A.; SHAPIRO, T. A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 9, p. 3726-3730, 1995.

BODLEY, A. L.; CHAKRABORTY, A. K.; XIE, S.; BURRI, C.; SHAPIRO, T.A. An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 13, p. 7639-7644, 2003.

BROCHIER-ARMANET, C.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. A DNA topoisomerase IB in Thaumarchaeota testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of Archaea and Eucarya. **Biology Direct.**, v. 3, n. 54, 2008.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, n. 3, p. 229-36, 2006.

CAVALCANTI, D. P.; FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. **Parasitol. Res.**, v. 94, p. 439-448, 2004.

CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. Agente etiológico de nova morbidade do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHAMPOUX, J. J. Type IA DNA topoisomerases: Strictly one step at a time. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 11998-12000, 2002.

CHAMPOUX, J. J.; DULBECCO, R. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA- a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryocells-dye binding assay). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 69, p. 143-146, 1972.

CHANGELA, A.; DIGATE, R. J.; MONDRAGON, A. Crystal structure of a complex of a type IA DNA topoisomerase with a single-stranded DNA molecule. **Nature**, v. 411, n. 6841, p. 1077-1081, 2001.

CHEN, S. J., WANG; J. C. Identification of active-site residues in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 6050-6056, 1998.

CHEN, C.F.; BRILL, S.J. Binding and activation of DNA topoisomerase III by the Rmi1 subunit. **J Biol Chem** v.282, p. 28971–28979, 2007.

CHEN, S. H.; WU, C. H.; PLANK, J. L.; HSIEH, T. S. Essential Functions of C Terminus of *Drosophila* Topoisomerase III₁ in Double Holliday Junction Dissolution. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 23, p. 19346-53, 2012.

CHEN, S.H.; CHAN, N.L.; HSIEH, T.S. New Mechanistic and Functional Insights into DNA Topoisomerases **Annu. Rev. Biochem.** V.82, p.139–169, 2013.

CHENG, C.; KUSSIE, P.; PAVLETICH, N.; SHUMAN, S. Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. **Cell**, v. 92, p. 841-850, 1998.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.**, v. 21, n. 8, p.1881-1888, 2002.

CLAYTON, C. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania* . **MBP** v.97, p. 221-224, 1998.

CORBETT, K.D.; BERGER, J.M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 33, p. 95–118, 2004.

COURA, J. R.; De CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

DANCEY, J.; EISENHAUER, E. A. Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. **Br. J. Cancer.**, v. 74, p. 327-338, 1996.

DAS, A.; MANDAL, C.; DASGUPTA, A. ; SENGUPTA T, MAJUMDER HK. An insight into the active site of a type I DNA topoisomerase from the kinetoplastid protozoan *Leishmania donovani*. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 30, n. 3, p. 794-802, 2002.

DAS, A.; DASGUPTA, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends. Parasitol.**, v. 20, n. 8, p. 381-387, 2004a.

DAS, B. B.; SEN, N.; GANGULY, A.; MAJUMDER, H. K. Reconstitution and functional characterization of the unusual bi-subunit type I DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*. **FEBS Lett.**, v. 565, p. 81-88, 2004b.

DAS, B. B.; SENGUPTA, T.; GANGULY, A.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? **Mol. Microbiol.**, v. 62, n. 4, p. 917-927, Nov., 2006.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-283, 1983.

DEKKER, N. H.; RYBENKOV, V. V.; DUGUET, M.; CRISONA, N. J.; COZZARELLI, N. R.; BENSIMON, D.; CROQUETTE, V. The mechanism of type IA topoisomerases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 19, p. 12126-31, 2002.

DELESPAUX, V.; GEYSEN, D.; GEERTS, A. S. Point mutations in mitochondrial topoisomerase enzymes of *Trypanosoma congolense* are not involved in isometamidium resistance. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 151, n. 1, p. 137-40, 2007.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: Brener, Z.; Barral-Neto, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

DINARDO, S.; VOELKEL, K.; STERNGLANZ, R. DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, n. 9, p.2616-2620, 1984.

DRLICA, K. Control of bacterial DNA supercoiling. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 425-433, 1992.

DROLETS, M.; BI, X.; LIU, L. F. Hypernegative Supercoiling of the DNA Template during Transcription Elongation *in vitro*. **J Biol Chem**, v. 269, n. 3, p. 2068-2074, 1994.

DURNFORD, J. M.; CHAMPOUX, J. J. The DNA untwisting enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 4, p. 1086-1089, 1978.

ELLIS, N. A.; GRODEN, J. Ye.; STRAUGHEN, J.; LENNON, D. J.; CIOCCI, S.; PROYTCHEVA, M.; GERMAN, J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. **Cell**. v. 83, p. 655-666, 1994.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.;

BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; da SILVEIRA, J.F.; de JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; McCULLOCH, R.; McKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; van AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**. 309: 409-415, 2005a.

ESPOSITO, D.; SCOCCA, J. J. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3605-3614, 1997.

FORTERRE, P.; BERGERAT, A.; LOPEZ-GARCIA, P. The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. **FEMS, Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 237-248, 1996.

FORTERRE, P.; GRIBALDO, S.; GADELLE, D.; SERRE, M.C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**. v.89, n.4, p.427-46, 2007.

FRAGOSO, S. P.; MATTEI, D.; HINES, J. C.; RAY, D.; GOLDENBERG, S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 94, p. 197-204, 1998.

GALANTI, N.; DVORAK, J.A.; GRENET, J.; McDANIEL, J.P. Hydroxyurea-Induced synchrony of DNA replication in the kinetoplastida. **Exp Cell Res**. v. 214, p. 225-230, 1994.

GANGLOFF, S.; MCDONALD, J.P.; BENDIXEN, C.; ARTHUR, L.; ROTHSTEIN, R. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. **Mol Cell Biol** v.14, p. 8391–8398, 1994.

GANGLOFF, S.; DE MASSY, B.; ARTHUR, L.; ROTHSTEIN, R.; FABRE, F. The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. **EMBO J.**, v. 18, p. 1701-1711, 1999.

GARCÍA-ESTRADA, C.; PRADA, C. F.; FERNÁNDEZ-RUBIO, C.; ROJO-VÁZQUEZ, F.; BALAÑA-FOUCE, R. DNA topoisomerases in apicomplexa parasites: promising targets for drug discovery. **Proc. Biol. Sci.**, n. 277, p. 1777-1787, 2010.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. A. DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 73, p. 3872-3876, 1976.

GIORDANO, R.; FOUTS, D.L.; TEWARI, D.; COLLI, W.; MANNING, J.E.; ALVES, M.J. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **J Biol Chem**, v. 274, n.6, p. 3461-3468, 1999.

GONZALES-PERDOMO, M.; CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. S. L.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 34, p. 1707-1714, 1990.

GOODWIN, A.; WANG, S.W.; TODA, T.; NORBURY, C.; HICKSON, I.D. Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleic. Acids Res.**, v. 27, n. 20, p. 4050-4058, 1999.

GRABOWSKI, D. R.; HOLMES, K. A.; AOYAMA, M.; YE, Y.; RYBICKI, L. A.; BUKOWSKI R. M.; GANAPATHI, M. K.; HICKSON, I. D.; GANAPATHI, R. Altered drug interaction and regulation of topoisomerase IIbeta: potential mechanisms governing sensitivity of HL-60 cells to amsacrine and etoposide. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 6, p. 1340-1345, 1999.

HANDE, M. P.; SAMPER, E.; LANSDORP, P.; BLASCO, M. A. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. **J. Cell. Biol.**, v. 144, n. 4, p. 589-601, 1999.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. today**, v. 12, p. 108-114, 1996.

HENSON, J. D.; NEUMANN, A. A.; YEAGER, T. R.; REDDEL, R. R. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. **Oncogene**, v. 21, n. 4, p. 598-610, 2002.

HIASA, H.; DIGATE, R. J.; MARIANS, K. J. Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during oriC and pBR322 DNA replication *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 3, p. 2093-2099, 1994.

HOARE C. A.; WALLACE, G. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellate: a new terminology. **Nature**, v. 202, p. 1385-1386, 1966.

HSIEH, T.; BRUTLAG, D. ATP-dependent DNA topoisomerase from *D. melanogaster* reversibly catenates duplex DNA rings. **Cell**, v. 21, n. 1, p. 115-125, 1980.

JAXEL, C.; CAPRANICO, G.; KERRIGAN, D.; KOHN, K. W.; PORNMIER, Y. Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 30, p. 20418-20423, 1991.

KATO, J. NISHIMURA, Y. IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, n. 2, p. 393-404, 1990.

KIM D.; CHIURILLO, M.A.; EL-SAYED, N.; JONES, K.; SANTOS, M.R.; PORCILE, P.E.; ANDERSSON, B.; MYLER, P.; Da SILVEIRA, J.F.; RAMIREZ, J.L.; Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. **Gene**, v. 346, p.153-161, 2005.

KIM, H. S.; CROSS, G. A. TOPO 3 alpha influences antigenic variation by monitoring expression-site-associated VSG switching in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Patho.** v. 6, 2010.

KIM, H. S.; CROSS, G. A. Identification of *Trypanosoma brucei* RMI1/BLAP75 Homologue and Its Roles in Antigenic Variation. **PLoS One**, v. 6, n. 9, 2011.

KIM, R. A.; CARON, P. R.; WANG, J. C. Effects of yeast DNA topoisomerase III on telomere structure (genome stability/genetic recombination/subtelomeric elements/EST1 gene/TOP3gene). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 2667-2671, 1995.

KIM, Y-C.; LEE, J.; KOO, H-S. Functional characterization of *Caenorhabditis elegans* DNA topoisomerase III α . **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 2012-2017, 2000.

KIRKEGAARD, K.; WANG, J. C. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. **J. Mol. Biol.**, v. 185, n. 3, p. 625–37, Oct., 1995.

KOSTER, D. A.; CROQUETTE, V.; DEKKER, C.; SHUMAN, S.; DEKKER, N. H. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. **Nature**, v. 434, n. 7033, p.671-674, 2005.

KWAN, K. Y.; WANG, J. C. Mice lacking DNA topoisomerase III β develop to maturity but show a reduced mean lifespan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 10, p. 5717–5721, 2001.

KWAN, K. Y.; MOENS, P. B.; WANG, J. C. Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III β . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 5, p. 2526–2531, 2003.

KWAN, K. Y.; GREENWALD, R. J.; MOHANTY, S.; SHARPE, A. H.; SHAW, A. C.; WANG, J. C. Development of autoimmunity in mice lacking DNA topoisomerase 3 β . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, n. 22, p. 9242–9247, 2007.

LAURSEN, L. V.; AMPATZIDOU, E.; ANDERSEN, A. H.; MURRAY, J. M. Role for the fission yeast RecQ helicase in DNA repair in G2. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 3692–3705, 2003.

LAZARUS, G. M.; HENRICH, J. P.; KELLY, W. G.; SCHMITZ, S. A.; CASTORA, F. J. Purification and characterization of a type I DNA topoisomerase from calf thymus mitochondria. **Biochemistry**, v. 26, n. 19, p. 6195-203, 1987.

LEBEDEVA, N.; RECHKUNOVA, N.; BOITEUX, S.; LAVRIK, O. Trapping of Human DNA Topoisomerase I by DNA Structures Mimicking Intermediates of DNA Repair. **IUBMB Life**. v. 60, n. 2, p. 130–134, 2008.

LEE, M. P.; BROWN, S. D.; CHEN, A.; HSIEH, T. S. DNA topoisomerase I is essential in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 14, p. 6656–6660, 1993.

LI, W.; WANG, J. C. Mammalian DNA topoisomerase III α is essential in early embryogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1010-1013, 1998.

LI, Z.; MONDRAGON, A.; DIGATE, R. J. The mechanism of type IA topoisomerase-mediated DNA topological transformations. **Mol. Cell**, v. 7, n. 2, p. 301-307, 2001.

LI, Z. Regulation of the cell division cycle in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**. v.11, n. 10, p. 1180-90, 2012.

LIMA, C. D.; WANG, J. C.; MONDRAGON, A. Three dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. Coli* DNA topoisomerase I. **Nature**, v. 367, p. 138-146, 1994.

LIU, J.; WU, T. C.; LICHTEN, M. The location and structure of double-strand DNA breaks induced during yeast meiosis: evidence for a covalently linked DNA-protein intermediate. **EMBO J.**, v. 14, n. 18, p. 4599-608, 1995.

LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 351-357, 1989.

MALANGA, M.; ALTHAUS, F.R. Poly (ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 7, p. 5244-8, 2004.

MANKOURI, H. W.; DICKSON, I. D. The RecQ helicase–topoisomerase III–Rmi1 complex: a DNA structure-specific ‘dissolvasome’? **Trends Biochem. Sci.**, n. 32, p. 538-546, 2007.

MASLOV, D. A.; SIMPSON, L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. **Parasitolol. Today**, v. 11, n. 1, p. 30-32, 1995.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G.A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol Biochem Parasitol**. v.59, p.327-329, 1993.

MO, Y. Y.; WANG, C.; BECK, W. T. A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 52, p. 41107-41113, 2000.

MOHANTY, S.; TOWN, T.; YAGI, T.; SCHEIDIG, C.; KWAN, K. Y.; ALLORE, H. G.; FLAVELL, R. A.; SHAW, A. C. Defective p53 engagement after the induction of DNA damage in cells deficient in topoisomerase 3 β . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 13, p. 5063–68, 2008.

MONDRAGÓN, A.; DiGATE, R. The structure of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. **Structure**, v. 7, p. 1373-1383, 1999.

MÖNNICH, M.; HESS, I.; WIEST, W.; BACHRATI, C.; HICKSON, I. D.; SCHORPP, M.; BOEHM, T. Developing T lymphocytes are uniquely sensitive to a lack of topoisomerase III alpha. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 9, p. 2379-84, 2010.

MORALES, R.; SRIRATANA, P.; ZHANG, J.; CANN, I. K. O. Methanosarcina acetivorans C2A Topoisomerase IIIa, an Archaeal Enzyme with Promiscuity in Divalent Cation Dependence **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

NG, S. W.; LIU, Y.; HASSELBLATT, K. T.; MOK, S. C.; BERKOWITZ, R. S. A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, n. 4, p.993-1000, 1999.

NICHOLS, M. D.; DEANGELIS, K.; KECH, J. L.; BERGER, J. M. Structure and function of na archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination fator Spo11. **EMBO J.**, v. 18, n. 21, p. 6177-6188, 1999.

NITISS, J. L. Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 63-81, 1998.

NORMAN-AXELSSON, U.; DURAND-DUBIEF, M.; PRASAD, P.; EKWALL, K. DNA topoisomerase III localizes to centromeres and affects centromeric CENP-A levels in fission yeast. **PLoS Genet.**, v. 9, n. 10, 2013.

OBADO, S.O.; BOT, C.; ECHEVERRY, M.C.; BAYONA, J.C.; ALVAREZ, V.E. TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **Nuc Ac Res**, 2011, Vol. 39, No. 3, p. 1023–1033, 2011.

OLIVEIRA-COSTA, J. P.; ZANETTI, J.; OLIVEIRA, L. R.; SOARES, F. A.; RAMALHO, L. Z.; RAMALHO, F. S.; GARCIA, S. B.; RIBEIRO-SILVA, A. 2010. Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. **Hum. Pathol.**, v. 41, n. 11, p. 1624-1630, 2010.

OPPERDOES, F. R. Carbohydrate and energy metabolism in aerobic Protozoa. In: MARR, J. J. & MÜLLER, M. **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites**. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, 1995.

PENG, H.; MARIANS, K. J. The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. **J. Biol. Chem.** v. 270, n. 42, p. 25286-90, 1995.

PEREZ-CHEEKS, B. A.; LEE, C.; HAYAMA, R.; MARIANS, K. J. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. **Mol Microb**, v. 86, n. 4, p. 1007–1022, 2012.

PERRY, K.; HWANG, Y.; BUSHMAN, F. D.; VAN DUYNE, G. D. Structural basis for specificity in the poxvirus topoisomerase. **Mol. Cell**, v. 23, n. 3, p. 343–354, 2006.

PLANK, J. L.; CHU, S. H.; POHLHAUS, J. R.; WILSON-SALI, T.; HSIEH, T. S. *Drosophila melanogaster* topoisomerase III α preferentially relaxes a positively or negatively supercoiled bubble substrate and is essential during development. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 5, p. 3564–73, Feb., 2005.

PLANK, J. L.; WU, J.; HSIEH, T. S. Topoisomerase III₂ and Bloom helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 30, p. 11118-23, 2006.

PODOBNIK, M.; MCLNERNEY, P.; O'DONNELL, M.; KURIYAN, J. A TOPRIM domain in the crystal structure of the catalytic core of *Escherichia coli* primase confirms a structural link to DNA topoisomerases. **J. Mol. Biol.**, v. 300, p. 353-362, 2000.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p.789–802, 2006.

POMMIER, Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. **ACS Chem. Biol.** v. 8, n. 1, p. 82–95, 2013.

PORTER, S. E.; CHAMPOUX, J. J. The basis for camptothecin enhancement of DNA breakage by eukaryotic topoisomerase I. **Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 541-550, 1989.

POURQUIER, P.; UENG, L. M.; KOHLHAGEN, G.; MAZUMDER, A.; GUPTA, M.; KOHN, K. W.; POMMIER, Y. Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and basic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 12, p. 7792-7796, 1997.

PRADA, C. F.; ALVAREZ-VELILLA, R.; BALAÑA-FOUCE, R.; PRIETO, C.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ESCUDERO-MARTÍNEZ, J. M.; REQUENA, J. M.;

ORDÓÑEZ, C.; DESIDERI, A.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Gimitecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochem. Pharmacol.**, v. 85, n. 10, p. 1433-40, 2013.

RAJAN, R.; PRASAD, R.; TANEJA, B.; WILSON, S. H.; MONDRAGON, A. Identification of one of the apurinic/apyrimidinic lyase active sites of topoisomerase V by structural and functional studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, n. 1, p. 657-66, 2013.

RAYNARD, S.; ZHAO, W.; BUSSEN, W.; LU, L.; DING, Y.Y.; Functional role of BLAP75 in BLM-topoisomerase IIIalpha-dependent holliday junction processing. **J Biol Chem** v.283, p.15701–15708, 2008.

Recombination and Genome Stability: A Double-Edged Sword? **Cell**, V. 62, P. 403-406, 1990.

REDINBO, M. R.; STEWART, L.; KUHN, P.; CHAMPOUX, J. J.; HOL, W. G. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. **Science**, v. 279, p. 1504-1503, 1998.

REDINBO, M. R.; CHAMPOUX, J. J.; HOL, W. G. J. Structural insights into the function of type IB topoisomerases. **Curr. Op. Struct. Biol.**, v. 9, p. 29-36, 1999.

RIGBY, P. W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C.; BERG, P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. **J. Mol. Biol.**, v. 113, n. 1, p. 237-251, 1977.

RIOU, G.F.; GABILLOT, M.; DOUC-RASY, S.; KAYSER, A.; BARROIS, M. A type I topoisomerase from *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.**, v. 134, p. 479-484, 1983.

ROTHSTEIN, R.; GANGLOFF, S. Hyper-recombination and Bloom's syndrome: microbes again provide clues about cancer. **Genome Res.**, v. 5, p. 421-426, 1995.

ROY, A.; D'ANNESSA, I.; NIELSEN, C. J.; TORDRUP, D.; LAURSEN, R. R.; KNUDSEN, B. R.; DESIDERI, A.; ANDERSEN, F. F. Peptide Inhibition of Topoisomerase IB from *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biol. Inter.**, v. 2011, 10 pages, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SCHOEFFLER, A. J.; BERGER, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, p. 41–101, 2008.

SCHOFIELD, M. A.; AGBUNAG, R.; MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. Cloning and sequencing of *Escherichia coli* mutR shows its identity to topB, encoding topoisomerase III. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 15, p. 5168-5170, 1992.

SCHUMUÑIS, G. A. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-12, 2000.

SCOCCA, J.; SHAPIRO, T.A. A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. **Mol. Microb.** v. 67, n.4, p. 820–829, 2008.

SEKI, M.; NAKAGAWA, T.; SEKI, T.; KATO, G.; TADA, S.; TAKAHASHI, Y.; YOSHIMURA, A.; KOBAYASHI, T.; AOKI, A.; OTSUKI, M.; HABERMANN, F. A.; TANABE, H.; ISHII, Y.; ENOMOTO, T. Bloom helicase and DNA topoisomerase III₂ are involved in the dissolution of sister chromatids. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, n. 16, p. 6299–6307, 2006.

SHAPIRO, T.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 117-143, 1995.

SHIMAMOTO, A.; NISHIKAWA, K.; KITAO, S.; FURUICHI, Y. Human RecQ5beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3-alpha and 3-beta. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 7, p. 1647-55, 2000.

SHOR, E.; GANGLOFF, S.; WAGNER, M.; WEINSTEIN, J.; PRICE, G.; Mutations in homologous recombination genes rescue top3 slow growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** v.162, p. 647–662, 2002.

SLESAREV, A. I.; STETTER, K. O.; LAKE, J. A.; GELLERT, M.; KRAH, R.; KOZYAVKIN, S. A. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. **Nature**, v. 364, n. 6439, p. 735–737, Aug., 1993.

SLESAREV, A. I.; BELOVA, G. I.; LAKE, J. A.; KOZYAVKIN, S. A. Topoisomerase V from *Methanopyrus kandleri*. **Methods Enzymol.**, v. 334, p. 179-192, 2001.

SNYDER, R. D. Evidence from studies with intact mammalian cells that merbarone and bis(dioxopiperazine)s are topoisomerase II poisons. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2003.

SOARES, M. J.; SOUTO-PADRÓN, T.; BONALDO, M. C.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 75, p. 522-527, 1989.

SOUZA, F. S. P.; RAMPAZZO, R. C. P.; MANHAES, L.; SOARES, M. J.; CAVALCANTI, D. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: Effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 172, p. 90-98, 2010.

SOUZA, R.T.; LIMA, F.M.; BARROS, R.M.; CORTEZ, D.R.; SANTOS, M.F.; CORDERO, E.M.; RUIZ, J.C.; GOLDENBERG, S.; TEIXEIRA, M.M.G.; DA SILVEIRA, J.F.; Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi* **PLoS ONE** v. 6, n.8, 2011.

SRIVENUGOPAL, K. S.; LOCKSHON, D.; MORRIS, D. R. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: Purification and characterization of a new type I enzyme. **Biochemistry**, v. 23, p. 1899-1906, 1984.

STEWART, L.; IRETON, G. C.; CHAMPOUX, J. J. The domain organization of human topoisomerase I. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 7602-7608, 1996.

SUZUKI, H.; NAGAI, K.; AKUTSU, E.; YAMAKI, H.; TANAKA, N. On the mechanism of action of bleomycin: strand scission of DNA caused by bleomycin and its binding to DNA *in vitro*. **J. Antibiot.** v.23, p.473-480, 1970.

TANEJA, B.; PATEL, A.; SLESAREV, A.; MONDRAGO, A. Structure of the N-terminal fragment of topoisomerase V reveals a new family of topoisomerases. **EMBO Journal**, v. 25, n. 2, p. 398-408, 2006.

TANG, S. C.; SHAPIRO, T. A. Newly identified antibacterial compounds are topoisomerase poisons in African trypanosomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 620-626, 2010.

TEMIME-SMAALI, N.; GUITTAT, L.; WENNER, T.; BAYART, E.; DOUARRE, C.; GOMEZ, D.; GIRAUD-PANIS, M.; LONDONO-VALLEJO, A.; GILSON, E.; AMOR-GUE´RET, M.; RIOU, J.F. Topoisomerase IIIa is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres. **The EMBO Journal**, v. 27, p. 1513–1524, 2008.

TETAUD, E.; LECUIX, I.; SHELDRAKE, T.; BALTZ, T.; FAIRLAMB, A.H. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**.v. 120, p.195-204, 2002.

TUDURI, S.; CRABBÉ, L.; CONTI, C.; TOURRIÈRE, H.; HOLTGREVE-GREZ, H.; JAUCH, A.; PANTESCO, V.; DE VOS, J.; THOMAS, A.; THEILLET, C.; POMMIER, Y.; TAZI, J.; COQUELLE, A.; PASERO, P. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1315-24, 2009.

UMAKI, A. C. S. **Estudo sobre as DNA topoisomerase do tipo I do *Trypanosoma cruzi***. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz/IOC – Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.

VALDÉS-REYES, L.; ARGUETA, J.; MORÁN, J.; SALAIZA, N.; HERNÁNDEZ, J.; BERZUNZA, M.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; BECKER, I.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. *Leishmania mexicana*: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells **Exp. Parasitol.** v. 121, n. 3, p. 199-207, Mar 2009.

WALLIS, J. W.; CHREBET, G.; BRODSKY, G.; ROLFE, M.; ROTHSTEIN, R. A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. **Cell**, v. 58, n. 2, p. 409-419, 1989.

WANG, J. C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. **J. Mol. Biol.**, v. 55, p. 523-533, 1971.

WANG, J. C. DNA topoisomerases as targets of therapeutics: an overview. **Adv. Pharmacol.**, v. 29, p. 1-19, 1994.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 635-692, 1996a.

WANG, Z.; ENGLUND, P. T. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. **EMBO J.**, v. 20, n. 17, p. 4674-4683, 2001.

WANG, Y.; LYU, L. Y.; WANG, J. C. Dual localization of human DNA topoisomerase III α to mitochondria and nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 12114-12119, 2002.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, n. 6, p.430-440, 2002.

WANG, J. Chap 5. In: BATES, A.D.; MAXWELL, A. DNA Topology. **Oxford University Press**, 2005.

WESTON D, PATEL B, VAN VOORHIS WC. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 98, n.1, p.105-116, 1999.

WORTHEN, C.; JENSEN, B. C.; PARSONS, M. Diverse effects on mitochondrial and nuclear functions elicited by drugs and genetic knockdowns in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 5, e678, 2010.

WRIGHT, J.A.; CHAN, A.K.; CHOY, B.K.; HURTA, R.A.; MCCLARTY, G.A; TAGGER, A.Y. Regulation and drug resistance mechanisms of mammalian ribonucleotide reductase, and the significance to DNA synthesis. **Biochem Cell Biol.** v.68, p.1364-1371, 1990.

WU, J.; FENG, L.; HSIEH, T. S. *Drosophila* topo III α is required for the maintenance of mitochondrial genome and male germ-line stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 6228–33, 2010.

YANG, J.; BACHRATI, C. Z.; HICKSON, I. D.; BROWN, G. W. BLM and RMI1 alleviate RPA inhibition of Topo III α decatenase activity. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012.

YANG, W. Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** v. 45, n. 6, p. 520-534, 2010.

YU, C. E.; OSHIMA, J.; FU, Y. H.; WIJSMAN, E. M.; HISAMA, F.; ALISCH, R.; MATTHEWS, S.; NAKURA, J.; MIKI, T.; OUAIS, S.; MARTIN, G. M.; MULLIGAN, J.; SCHELLENBERG, G. D. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. **Science**, v. 272, p. 258-262, 1996.

ZECHIEDRICH, E. L.; COZZARELLI, N. R. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. **Genes Dev.**, v. 9, n. 22, p. 2859-2869, 1995.

ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; MAIA, M. C.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 37, p. 449-56, 2011.

ZUMSTEIN, L.; WANG, J. C. Probing the structural domains and function in vivo of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I by mutagenesis. **J. Mol. Biol.**, v. 191, n. 3, p. 333-340, 1986.