



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular
Laboratório Interdisciplinar em Biociências



Influência do *Trypanosoma cruzi* sobre as vias de reparo de DNA da célula hospedeira

Ester Cardoso Paes Rose

Orientadora: Mariana Machado Hecht

Brasília - DF

2020

Ester Cardoso Paes Rose

**Influência do *Trypanosoma cruzi* sobre as vias de reparo de
DNA da célula hospedeira**

**Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Molecular da Universidade de
Brasília, como requisito parcial à
obtenção do Título de Doutor.**

Brasília - DF

2020

Aprovada em 29 de outubro de 2020

Banca Examinadora:

Dra. Mariana Machado Hecht (presidente)
Universidade de Brasília

Dr. Carlos Frederico Martins Menck
Universidade de São Paulo

Dra. Viviane Grazielle da Silva
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Izabella Marques Dourado Bastos Charneau
Universidade de Brasília

Dra. Doralina do Amaral Rabello Ramos (suplente)
Universidade de Brasília

*“Porque dEle, e por meio dEle,
e para Ele são todas as coisas.
A Ele, pois, a glória eternamente.”*

Romanos 11:36

Agradecimentos

Não foi fácil. Com muita sinceridade, não posso começar esta seção de agradecimentos sem antes constatar que não foram anos fáceis! E, uma vez constatado isso, a gratidão se torna ainda mais genuína por cada um que ajudou para que este trabalho virasse realidade. Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que verdadeiramente me amparou por todo este período, me dando sabedoria, paz e abrindo as portas para que toda a pesquisa pudesse ser realizada.

Agradeço de coração à minha orientadora, Mariana Hecht, que, em primeiro lugar, me chamou para este projeto e, desde o início, se mostrou solícita a me auxiliar em tudo o que precisasse. Agradeço cada ideia que cuidadosamente teve com o projeto, cada conselho, cada correção e também por me dar autonomia para sugerir e construirmos juntas esta pesquisa. De fato, uma orientação exemplar.

Agradeço a cada professor que me auxiliou na pesquisa, os do programa de pós-graduação em Patologia Molecular e em especial as professoras do laboratório Nadjar, Luciana e Juliana. Obrigada por sempre estarem disponíveis para tirar dúvidas, auxiliar em diversas metodologias, e também para opinar sobre o projeto com várias sugestões. Somos um time do qual orgulho muito!

Agradeço aos colegas de UnB e de laboratório, que me ajudaram tantas vezes e permitiram que a convivência fosse leve e amigável. Um agradecimento especial à Cássia, à Aline e à Isabella, por todo o cuidado que tiveram ao me ensinar e ajudar na preservação da cultura de células. Também agradeço aos Manatealoucas por toda a amizade e todos os “cafés-psicologias” e desabafos que nos fizeram mais fortes nos desafios do dia a dia. Agradeço também aos estagiários, especialmente à Tatiana e à Alessandra, que me ajudaram também na bancada nos últimos anos.

Sou muito grata também à professora Verônica e à professora Eliana, como também ao meu colega Pedro, que sempre me deram o maior apoio para a minha capacitação. Não teria conseguido sem o apoio de vocês.

Agradeço à minha família, sem a qual jamais teria chegado até aqui! Obrigada pela educação, pelo amparo, pelo consolo e por toda a ajuda, demonstradas desde as marmitas que me salvaram em dias corridos até na companhia no laboratório em finais de semana e feriados (inclusive véspera de Natal!). Vocês comemoraram junto comigo nas alegrias e também choraram junto comigo nas dificuldades! Agradeço por se fazerem sempre tão presentes!

Ao Tomaz, em especial, muito obrigada por toda a ajuda! Você não me deu só apoio emocional, mas me ajudou em todos os sentidos para que essa pesquisa saísse, com ideias,

incentivos e até pesquisa de bibliografia e metodologias! Você sonhou este sonho junto comigo, e afirmo com toda a certeza que esta pesquisa não seria a mesma sem você!

Agradeço aos meus amigos da biologia, que, mesmo depois de tantos anos formados, mantiveram o cuidado e a atenção para comigo. Muito obrigada por tantas vezes que me ajudaram tirando dúvidas e fazendo sugestões ao meu trabalho! Um agradecimento em especial às amigas Aline, Luiza e Stefania, por tantos almoços juntas (e videochamadas) que me ajudaram tanto nestes anos todos.

Não posso deixar de agradecer aos demais amigos que caminharam junto comigo, ouvindo desabafos, me incentivando e intercedendo por mim e pelo projeto. Aos Maqus, obrigada pela amizade e apoio desde o começo! Aos queridos do Canto de Lá, que também estiveram comigo desde o início e que foram meu oásis nestes anos. A cada um do PG e irmãos da IPN, agradeço o carinho e as orações.

Foram tantas as pessoas que fizeram a diferença para que este trabalho saísse, que é possível que eu tenha esquecido de citar alguém. Mas sou grata por cada um que se fez presente na pesquisa e na minha vida. Afinal, a vida só vale a pena quando é compartilhada.

Resumo

A resposta ao dano no DNA (DDR) é essencial para a manutenção do bom funcionamento da célula. Esta resposta consiste na ativação de *checkpoint* do ciclo celular e o mecanismo de reparo de DNA. Diferentes vias de reparo são ativadas dependendo do tipo de lesão. A cisplatina é uma droga intercalante que provoca adutos no DNA e ligações interfitas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante que, em concentrações supra-fisiológicas, causa dano ao DNA e outras moléculas. Os principais danos causados pelo estresse oxidativo são modificações de base e quebra de fita de DNA. Existem evidências de que o *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, atue de diversas maneiras no metabolismo da célula hospedeira, incluindo o metabolismo de DNA. Neste trabalho, analisamos a influência de duas cepas de *T. cruzi*, Berenice (DTU TcII) e Colombiana (DTU TcI), na resposta ao dano de DNA em células L6, de miócitos de rato. As células receberam tratamentos em duas concentrações diferentes de cisplatina e H_2O_2 e tiveram diversos aspectos da sua biologia celular avaliados, como viabilidade, proliferação, morfologia, degradação de DNA e expressão de genes de reparo e de ciclo celular. Percebe-se que a célula reage ao dano de DNA de forma diferente dependendo da concentração do composto usado, seja cisplatina, seja H_2O_2 . O tratamento com cisplatina mostrou que a cepa Berenice alterou a resposta ao dano, aumentando a intensidade de algumas vias de reparo (ex. MMR) e diminuindo a intensidade de resposta a quebras de dupla-fita (DSBs), o que provocou maior degradação de DNA e maior mortalidade. Também houve maior proliferação em células infectadas com Berenice e tratadas com cisplatina. As células infectadas por Colombiana, por outro lado, apresentaram um perfil de resistência à cisplatina, com ativação de diferentes vias eficazes ao reparo de adutos de DNA (como NER). Os resultados levantaram a hipótese se a infecção por Colombiana estimula o reparo alternativo via retrotransposon LINE-1. Também foi verificado um perfil de senescência destas células, assim como em células não infectadas. O tratamento com H_2O_2 mostrou que a infecção pelo *T. cruzi* pode atuar como um elemento estressor ou protetor do DNA hospedeiro, dependendo da cepa utilizada e da concentração de H_2O_2 . Diferenças na degradação de DNA (DSB ou SSB) sugerem que diferentes mecanismos estão atuando no reparo de DNA em cada grupo analisado. Também foi encontrada diferença na expressão de genes em células infectadas (ex. BER e HR) com a cepa Berenice, que diminuíram a intensidade de resposta no dano moderado. A infecção pela cepa Colombiana impediu a ativação de muitas das vias de resposta ao H_2O_2 (NER e MMR). Como, neste caso, a mortalidade não se alterou em relação ao controle, questiona-se uma influência direta do parasito no reparo de DNA do hospedeiro. As descobertas

apresentadas neste trabalho contribuem para a melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro e pode auxiliar tanto na melhor compreensão da patologia da doença de Chagas, como também ter aplicações em outras áreas, como a da pesquisa em câncer e trazer explicações para o dúbio papel oncoprotetor x oncogênico relatado para o *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, reparo de DNA, células L6, cisplatina, peróxido de hidrogênio, relação parasito-hospedeiro.

Abstract

The DNA Damage Response (DDR) is essential for genomic integrity and cell survival. This response involves cell cycle checkpoints and mechanisms of DNA repair. Depending on the damage type, different repair pathways are activated. Cisplatin is a drug that generates DNA adducts and interstrand crosslinks. Hydrogen peroxide (H₂O₂) is another compound that, in supraphysiological concentrations, damages DNA and other biomolecules. Oxidative stress causes mainly base modifications and DNA strand breaks. There are evidences that *Trypanosoma cruzi*, a protozoan that causes Chagas disease, interferes in different manners with the metabolism of the host cell, including DNA metabolism. In this research, we analyzed the influence of two *T. cruzi*'s strains, Berenice and Colombiana, in the DDR of L6 cells (rat myocytes). L6 cells were treated with two different concentrations of cisplatin and H₂O₂, and different biological aspects were evaluated, as viability, proliferation, morphology, DNA degradation and expression of repair and cell cycle genes. Depending on the concentration of cisplatin or H₂O₂, the cells reacted differently, showing distinct rates of DNA damage, considering the concentration of cisplatin or H₂O₂. Treatment with cisplatin showed that Berenice strain altered host damage response to DNA damage, with higher expression of some repair pathways (e.g. MMR) and lower expression of genes related to the repair of double strands breaks (DSB), resulting in DNA degradation and mortality. Cells infected with Colombiana strain, on the other hand, presented a cisplatin resistance profile, with activation of effective pathways to repair DNA adducts (as NER). The results also indicated that infection by Colombiana archetype stimulates an alternative repair via retrotransposon LINE-1. These cells also presented a senescent profile, similar to non-infected cells. Hydrogen Peroxide treatment showed that *T. cruzi* infection may act as a stressor or protective element of host DNA, depending on the strain and on the H₂O₂ concentration. Differences were also detected differences in gene expression in cells infected with Berenice strain, which reduced the DNA damage response intensity (e.g. BER and HR), in the treatment with 0,8mM of H₂O₂. Infection with *T. cruzi* Colombiana did not activate multiple pathways in response to H₂O₂ (NER and MMR). These cells did not show significant differences in mortality, indicating that maybe the parasite influences the host DNA to repair itself directly. Our results will contribute to a better understanding of the parasite-host relationship and can not only clarify Chagas disease pathology, but also help to understand the dubious role of *T. cruzi* in response to cancer.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, DNA repair, L6 cell, cisplatin, hydrogen peroxide, host-parasite relationship.

Figuras

FIGURA 1. DANOS AO DNA E VIAS DE REPARO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO.	7
FIGURA 2. LESÕES AO DNA POR AGENTES GENOTÓXICOS.	9
FIGURA 3. CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E EXPOSIÇÃO A FATORES GENOTÓXICOS.	15
FIGURA 4. PROTOCOLO DE PARASITEMIA PELA COLORAÇÃO DE PKH26.	23
FIGURA 5. <i>DOT BLOT</i> DE CÉLULAS COLETADAS NO CITÔMETRO DE FLUXO.	25
FIGURA 6. PADRONIZAÇÃO DE EXPERIMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE APOPTOSE/NECROSE POR ANEXINA/PI.	26
FIGURA 7. CURVA PADRÃO E CURVA DE <i>MELTING</i> DOS <i>PRIMERS</i> DO HOSPEDEIRO UTILIZADOS NO TRABALHO.	30
FIGURA 8. CURVA PADRÃO E CURVA DE <i>MELTING</i> DOS <i>PRIMERS</i> DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> UTILIZADOS NO TRABALHO.	31
FIGURA 9. CULTURA DE CÉLULAS L6 INFECTADAS COM DIFERENTES CEPAS DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E VISUALIZADAS <i>A FRESCO</i> OU APÓS COLORAÇÃO COM GIEMSA.	33
FIGURA 10. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA POR MEIO DA COLORAÇÃO COM PKH26.	34
FIGURA 11. MORTALIDADE EM CÉLULAS SEM INFECÇÃO E INFECTADAS POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	35
FIGURA 12. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS L6 INFECTADAS OU NÃO COM O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	36
FIGURA 13. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CISPLATINA NA TAXA DE MORTALIDADE E DEGRADAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS L6.	37
FIGURA 14. RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CISPLATINA (μM) COM A TAXA DE MORTALIDADE (SUB-G1) DE CÉLULAS L6 INFECTADAS OU NÃO COM O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	38
FIGURA 15. EFEITO DA CISPLATINA A 25 μM OU 100 μM NA MORTALIDADE (SUB-G1) DE CÉLULAS L6 INFECTADAS OU NÃO COM O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	40
FIGURA 16. TIPO DE MORTE CELULAR DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , EXPOSTAS À CISPLATINA.	42
FIGURA 17. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CISPLATINA NA DEGRADAÇÃO DE DNA DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	43
FIGURA 18. DEGRADAÇÃO DE DNA E REPARO EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM CISPLATINA A 25 OU 100 μM .	44
FIGURA 19. TESTE DO COMETA ALCALINO E NEUTRO EM CÉLULAS TRATADAS COM CISPLATINA 100 μM .	45
FIGURA 20. PROLIFERAÇÃO CELULAR EM GRUPOS TRATADOS COM CISPLATINA, INFECTADOS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	46
FIGURA 21. QUANTIDADE DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , NA FASE G1 EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE CISPLATINA.	47
FIGURA 22. PROLIFERAÇÃO E MORFOLOGIA DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM CISPLATINA 25 μM .	48
FIGURA 23. CICLO CELULAR COM TRATAMENTO DE CISPLATINA 100 μM EM CÉLULAS L6 INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	49
FIGURA 24. EXPRESSÃO DE BCL2 E P53 DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , E TRATADAS COM CISPLATINA.	50

FIGURA 25. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO EM CÉLULAS TRATADAS COM CISPLATINA, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	52
FIGURA 26. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM CISPLATINA 25 μ M.	54
FIGURA 27. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM CISPLATINA 100 μ M.	55
FIGURA 28. EXPRESSÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA DO RETROELEMENTO LINE1 EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM CISPLATINA.	56
FIGURA 29. EXPRESSÃO DE P16, P21 E KI67 DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , E TRATADAS COM CISPLATINA.	57
FIGURA 30. EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM SENESCÊNCIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CULTURAS DE L6, TRATADAS COM CISPLATINA 25 μ M, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	58
FIGURA 31. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO RELACIONADOS À RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CISPLATINA, EM CÉLULAS L6 INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	59
FIGURA 32. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE XRCC4, RAD51 E BRCA1.	60
FIGURA 33. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS BER, NER E MMR.	61
FIGURA 34. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P21, P53 E ATM EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM CISPLATINA 100 μ M.	62
FIGURA 35. CURVA DE VIABILIDADE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> TRATADOS COM CISPLATINA 100 μ M.	63
FIGURA 36. QUANTIDADE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS TRATADAS COM CISPLATINA 100 μ M, A PARTIR DA QUANTIFICAÇÃO DE Tc40S.	64
FIGURA 37. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> NO TRATAMENTO COM CISPLATINA.	65
FIGURA 38. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CÉLULAS L6.	66
FIGURA 39. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (mM) NA MORTALIDADE (SUB-G1) DE CÉLULAS L6 INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	67
FIGURA 40. MORTALIDADE DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM H ₂ O ₂ 0,8mM.	68
FIGURA 41. MORTALIDADE DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , E TRATADAS COM H ₂ O ₂ 1,6mM.	69
FIGURA 42. TIPO DE MORTE CELULAR DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , APÓS TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	70
FIGURA 43. DEGRADAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , E TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	71
FIGURA 44. DEGRADAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO A 0,8mM OU A 1,6mM.	72
FIGURA 45. PROLIFERAÇÃO CELULAR EM GRUPOS TRATADOS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, INFECTADOS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	73
FIGURA 46. CICLO CELULAR DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , E TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	74

FIGURA 47. CICLO CELULAR DE CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , APÓS TRATAMENTO COM H ₂ O ₂ 0,8mM.	75
FIGURA 48. CICLO CELULAR DE CULTURAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , APÓS TRATAMENTO COM H ₂ O ₂ 1,6mM.	76
FIGURA 49. EXPRESSÃO DE BCL2 E p53 EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	77
FIGURA 50. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	78
FIGURA 51. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DNA EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 0,8mM (A-D e H) E 1,6mM (E-G e I).	80
FIGURA 52. EXPRESSÃO DE p16, p21 E Ki67 EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	81
FIGURA 53. CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DE BCL2, RAD51, ATM E XRCC1 EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 0,8mM.	82
FIGURA 54. CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GENES DE BER, NER E MMR EM CÉLULAS TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	83
FIGURA 55. CORRELAÇÃO DE EXPRESSÃO DE ATM, p21 E p53 EM CÉLULAS L6, INFECTADAS OU NÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	84
FIGURA 56. VIABILIDADE DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> APÓS TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 1,6mM.	85
FIGURA 57. QUANTIDADE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 1,6mM, A PARTIR DA QUANTIFICAÇÃO DE Tc40S.	86
FIGURA 58. EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> NO TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	87
FIGURA 59. EFEITO DA CISPLATINA EM CÉLULAS L6.	94
FIGURA 60. INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> BERENICE EM CULTURAS L6 TRATADAS COM CISPLATINA.	99
FIGURA 61. INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> COLOMBIANA NO TRATAMENTO COM CISPLATINA.	104
FIGURA 62. REPARO DE CÉLULA L6 SOB TRATAMENTO COM H ₂ O ₂ .	108
FIGURA 63. INFLUÊNCIA DE <i>T. CRUZI</i> BERENICE NO TRATAMENTO COM H ₂ O ₂ .	111
FIGURA 64. INFLUÊNCIA DE <i>T. CRUZI</i> COLOMBIANA NO TRATAMENTO COM H ₂ O ₂ .	113

Tabela

TABELA 1. SEQUÊNCIA DE PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE QPCR, JUNTAMENTE COM A TEMPERATURA DE ANELAMENTO UTILIZADA NO PROGRAMA DA REAÇÃO.

Abreviaturas e Siglas

8-oxoG: 8-oxo-guanina

ANOVA – análise de variância

AP – apurínico/apirimidínico

APE-1 – endonuclease apurínica/apirimidínica

ATM – ataxia telangiectasia mutada

ATP – adenosina trifosfato

ATR – a ataxia telangiectasia e proteína relacionada com Rad3

BALB/C – linhagem genética do rato albino c

BCL2 – linfoma de células B 2 (proteína)

BER – reparo por excisão de base

BFT – toxinas de *Bacteroides fragilis*

BRCA1 – câncer de mama 1 (proteína)

BRCA2 – câncer de mama 2 (proteína)

CDC25 – fosfatase de divisão celular 25

CDK – quinase ciclo dependente

cDNA – DNA complementar

CDT – toxina distensora citoletal

céls – células

Chk1 – quinase de *checkpoint* 1

Chk2 – quinase de *checkpoint* 2

CO₂ – dióxido de carbono

Cu – Cobre

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol (marcador fluorescente)

DDB2 – proteína 2 de ligação a danos de DNA

DDR – resposta ao dano de DNA

DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA – ácido desoxirribonucleico.

DNA-PK – proteína quinase dependente de DNA

DNA-SCARS – Segmentos de DNA com alterações de cromatina reforçando senescência

DSB – quebra de dupla fita de DNA

DTU – unidade discreta de tipagem

EBV – vírus Epstein-Barr

ERCC1 – proteína de reparo por excisão de DNA

EXO1 – exonuclease 1

Fe - ferro

FEN1 – *Flap* endonuclease 1

G0 – fase do ciclo celular gap 0 (quiescência)

G1 – fase do ciclo celular *gap* 1 (intérfase)

G2 – fase do ciclo celular *gap* 2 (pós-sintética)

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GG-NER – reparo por excisão de base genoma global

h – horas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HBV – vírus da hepatite B

HCMB – citomegalovírus

HCV – vírus da hepatite C

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HPV – papiloma vírus humano

HR – recombinação homóloga

IARC – agência internacional de pesquisa em câncer

ICL – *crosslinks* interfita

IU – unidade internacional

kDNA – DNA do cinetoplasto

LINE1 – elemento nuclear longo intercalado 1

LIT – meio de infusão de fígado triptose

LPS – lipossarídeo

M – molar

M – fase mitótica do ciclo celular

MIQE – Informação mínima para publicação de experimentos de PCR quantitativa em tempo real

MLH1 – Homólogo 1 da MutL

MLH6 – Homólogo 6 da MutL

MMEJ – junção final mediada por microhomologia

MMR – reparo de bases mal pareadas

MRE11 – homólogo de recombinação meiótica 11

mRNA – RNA mensageiro

MSH2 – Homólogo 2 da MutS
MSH6 – Homólogo 6 da MutS
MSI – instabilidade de microssatélites
NaCl – cloreto de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
NBS1 – nibrina
NER – reparo por excisão de fita
NHEJ – reparo por junção não homóloga
O₂ – oxigênio
OGG1 – 8-oxoguanina glicosilase
OH – radical hidroxila
PARP1 – poli [ADP-ribose] polimerase 1
PBS – tampão fosfato salino
PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular
PI – iodeto de propídeo
PI3K – fosfoinositídeo 3-quinase
PIKK – quinase relacionada a fosfoinositídeo 3-quinase
POL – polimerase
qPCR – reação de polimerase em cadeia quantitativa
Quantif. – quantificação
RB – proteína retinoblastoma
RCF – fator de replicação C
RECQL – DNA helicase ATP dependente Q1
RNA – ácido ribonucléico
RNase - ribonuclease
RNS – espécie reativa de nitrogênio
ROS – espécie reativa de oxigênio
RPA – proteína de replicação A
RT-qPCR – reação de polimerase em cadeia transcriptase reversa quantitativa
S – fase do ciclo celular de síntese de DNA
SFB – soro fetal bovino
SMUG1 – uracil glicosilase 1 monofuncional seletiva de simples fita
SSB – quebra de simples fita de DNA
TBE - Tris/Borato/EDTA

TBP – proteína de ligação TATA

Tc – relativo a *Trypanosoma cruzi*

TC-NER – reparo por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição.

TFIIH – fator de transcrição 2 humano

Tg – timina-glicol

TLS – síntese translesão

UV – ultravioleta

V - volts

XLF – fator tipo XRCC4

XPA – proteína complementar Xeroderma pigmentoso tipo A

XPC – proteína complementar Xeroderma pigmentoso tipo C

XPF – proteína complementar Xeroderma pigmentoso tipo F

XPG – proteína complementar Xeroderma pigmentoso tipo G

XRCC1 – proteína 1 complementar de reparo de raios-X

XRCC4 – proteína 4 complementar de reparo de raios-X

Índice

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1 VIAS DE REPARO DE DNA E SUA IMPORTÂNCIA EVOLUTIVA	1
1.1 SISTEMA DE REPARO DA CÉLULA DE MAMÍFERO	2
1.2 CHECKPOINT E APOPTOSE	2
1.3 VIAS DE REPARO DO DNA	4
1.3.1 Agentes genotóxicos e tipos de lesões ao DNA	7
1.3.2 Falha no Sistema de Reparo e a proliferação celular descontrolada	10
1.4 SENESCÊNCIA CELULAR	11
2 O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	13
2.1 O SISTEMA DE REPARO DE DNA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E SUA IMPORTÂNCIA NA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	16
II. JUSTIFICATIVA	19
III. OBJETIVOS	20
1. OBJETIVOS GERAIS	20
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
IV. METODOLOGIA	21
1 CULTIVO DE CÉLULAS	21
2 CULTIVO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	21
3 INFECÇÃO POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	21
4 DETECÇÃO DE PARASITEMIA	21
4.1 A FRESCO	22
4.2 LÂMINAS CORADAS COM GIEMSA	22
4.3 COLORAÇÃO PKH26	22
5 TRATAMENTO COM CISPLATINA	23
6 TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)	24
7 PERFIL DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	24
8 DETECÇÃO DE POPULAÇÃO COM APOPTOSE/NECROSE	25
9 TESTE DO COMETA	26

9.1	ALCALINO	26
9.2	NEUTRO	27
10	AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	27
11	MORFOLOGIA CELULAR	27
12	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	28
13	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES	28
14	QUANTIFICAÇÃO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> A PARTIR DE TC40S	32
15	TESTES ESTATÍSTICOS	32

V. RESULTADOS **33**

1	DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA	33
2	EFEITO DA INFEÇÃO POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS L6	34
2.1	EFEITO DA INFEÇÃO NA MORTALIDADE	34
2.2	EFEITO DA INFEÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE DNA E REPARO	35
2.3	EFEITO DA INFEÇÃO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	35
2.4	EFEITO DA INFEÇÃO NA EXPRESSÃO DE GENES	36
3	INFLUÊNCIA DA INFEÇÃO APÓS TRATAMENTO COM CISPLATINA	37
3.1	EFEITO DA CISPLATINA NA MORTALIDADE DE CÉLULAS L6	37
3.2	EFEITO DA INFEÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> EM CÉLULAS L6 EXPOSTAS À CISPLATINA	38
3.2.1	Efeito na mortalidade	38
3.2.2	Classificação da Morte Celular	41
3.2.3	Efeito na degradação de DNA	43
3.2.4	Efeito na proliferação celular	45
3.2.5	Efeito na expressão de genes	49
3.2.5.1	Genes relacionados à mortalidade celular	49
3.2.5.2	Genes envolvidos no reparo de DNA	51
3.2.5.3	Expressão do retroelemento LINE 1	55
3.2.5.4	Genes de proliferação e senescência	56
3.2.5.5	Testes de Correlação de Expressão Gênica	58
3.3	EFEITO DA CISPLATINA NO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	62
3.3.1	Efeito da cisplatina na mortalidade do <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
3.3.2	Efeito da cisplatina na parasitemia de células infectadas	63
3.3.3	Efeito da cisplatina na expressão de genes de reparo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
4	INFLUÊNCIA DA INFEÇÃO APÓS TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)	66
4.1	EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA VIABILIDADE DE CÉLULAS L6	66
4.2	EFEITO DA INFEÇÃO COM TRATAMENTO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	67

4.2.1	Efeito na Mortalidade	67
4.2.2	Classificação da Morte Celular	69
4.2.3	Efeito na Degradação de DNA	71
4.2.4	Efeito na Proliferação Celular	73
4.2.5	Efeito na expressão gênica	76
4.2.5.1	Expressão de genes relacionados à mortalidade celular	76
4.2.5.2	Expressão genes envolvidos no reparo de DNA	77
4.2.5.3	Expressão do retroelemento LINE 1	80
4.2.5.4	Expressão de genes relacionados com senescência e proliferação celular	81
4.2.5.5	Testes de Correlação de Expressão Gênica	82
4.3	EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	84
4.3.1	Efeito na mortalidade de <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
4.3.2	Efeito na parasitemia de células infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com Peróxido de Hidrogênio	85
4.3.3	Efeito do tratamento de H ₂ O ₂ na expressão de genes de reparo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
<u>VI. DISCUSSÃO</u>		88
1 EFEITO DA INFECCÃO NA CÉLULA L6		88
2 TRATAMENTO COM CISPLATINA		90
2.1	EFEITO DA CISPLATINA NA CÉLULA L6	90
2.2	INFLUÊNCIA DA CISPLATINA NO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	94
2.3	INFLUÊNCIA DA CEPA BERENICE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS L6 TRATADAS COM CISPLATINA	95
2.4	INFLUÊNCIA DA CEPA COLOMBIANA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS L6 TRATADAS COM CISPLATINA	100
3 TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO		105
3.1	EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA CÉLULA L6	105
3.2	INFLUÊNCIA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	108
3.3	INFLUÊNCIA DA CEPA BERENICE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS L6 TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	109
3.4	INFLUÊNCIA DA CEPA COLOMBIANA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM CÉLULAS L6 TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	111
<u>VII. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</u>		114
<u>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>		116

<u>IX.</u> <u>ANEXO I</u>	<u>132</u>
---	-------------------

<u>X.</u> <u>ANEXO II</u>	<u>134</u>
---	-------------------

I. Introdução e Revisão Bibliográfica

1 Vias de reparo de DNA e sua importância evolutiva

A manutenção da integridade genômica é essencial para manutenção da espécie. Diariamente, o genoma está exposto a diversos fatores causadores de lesões, tais como agentes genotóxicos ou estresse ambiental, espécies reativas de oxigênio liberadas no metabolismo celular, luz ultravioleta, radiação ionizante, além da própria hidrólise espontânea de nucleotídeos (DINANT; HOUTSMULLER; VERMEULEN, 2008). A manutenção das informações contidas no DNA garante a passagem fiel de informações genéticas para a progênie. Por outro lado, a diversificação do genoma permite também a manutenção da aptidão da população, garantindo variabilidade genética e adaptação a diferentes condições ambientais. É necessário, portanto, um equilíbrio entre a estabilidade e a diversificação do genoma da célula.

O DNA é um longo polímero de fita dupla composto por unidades de nucleotídeos, que alinhadas compõem informações genéticas (WATSON; CRICK, 1953). Além das moléculas intercaladas de açúcar e fosfato, unidas por ligações fosfodiéster, os nucleotídeos também contêm um dos quatro tipos de bases nitrogenadas - adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). Inicialmente visto como uma entidade molecular altamente estável, hoje sabe-se que o DNA apresenta um estado bastante dinâmico, sujeito a eventos de replicação, recombinação e reparo (FRIEDBERG, 2003). Como está sujeito a uma série de lesões de causas endógenas e exógenas, que podem levar a mutações deletérias e prejudiciais para a célula, os organismos desenvolveram uma série de sistemas de reparo que funcionam para identificar e corrigir erros, evitando assim o comprometimento de seu genoma. Estudos moleculares dos mecanismos de reparo de DNA mostram que essa maquinaria e suas funções são bastante conservadas de procariotos a eucariotos (ISHINO *et al.*, 2016).

Diversos mecanismos envolvidos no metabolismo de DNA, isto é, replicação, transcrição e reparo, estão presentes nos três grandes domínios da vida: Bacteria, Archaea e Eukarya (GRASSO; TELL, 2014). Estudos em bactérias são frequentemente utilizados para melhor compreensão dos mecanismos de reparo celular (KLEIN *et al.*, 2019). Sabe-se que Archaea e Eukarya apresentam grande proximidade em sua maquinaria molecular, principalmente na transcrição e replicação de DNA (GRASSO; TELL, 2014). Entretanto, com relação ao reparo de DNA, Archaea tem muitas peculiaridades. Muito ainda precisa ser elucidado sobre a maquinaria de reparo destes organismos, mas as pesquisas recentes mostram que as arqueias não são protoeucariotos ou bactérias diferentes, mas são organismos únicos e

diversos, inclusive com as enzimas homólogas adquirindo funções diversas (WHITE; ALLERS, 2018). Muitos pesquisadores sugerem que os eucariotos e Archaea têm uma história evolutiva compartilhada (ROUILLON; WHITE, 2011), e outros sugerem que os eucariotos adquiriram algumas maquinarias por simbiose com bactérias (WHITE; ALLERS, 2018). De qualquer forma, o estudo da maquinaria de reparo tem permitido que muito do passado evolutivo seja esclarecido.

1.1 Sistema de Reparo da célula de mamífero

Para o bom funcionamento da célula e do organismo, é essencial que a informação genômica mantenha-se íntegra. As principais alterações de DNA consistem em: quebra de fita simples (SSB); quebra de fita dupla (DSB); *crosslink* inter e intra-fitas; modificação, oxidação ou alquilação de bases; formação de adutos químicos volumosos; e ligação entre nucleotídeos adjacentes (LÓPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2009).

Para a manutenção da integridade do DNA, a célula possui mecanismos conhecidos como resposta ao dano no DNA (DDR, do inglês *DNA Damage Response*). A DDR possui dois braços principais: a ativação de *checkpoint* do ciclo celular e/ou apoptose, e o mecanismo de reparo *per se* (MAGNUSON; BEDI; LJUNGMAN, 2016). Existem indicações claras de que danos ao DNA não reparados podem levar ao surgimento de mutações, que, por sua vez, pode levar ao surgimento de doenças, como o câncer (MENCK; MUNFORD, 2014).

1.2 Checkpoint e apoptose

A resposta celular ao dano no DNA inclui a detecção do dano, ativação das vias *checkpoint*, supressão do ciclo celular e o início dos mecanismos de reparo (LÓPEZ-CAMARILLO *et al.*, 2009). Os mecanismos de reparo do DNA estão intimamente ligados à regulação do ciclo celular: as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) se comunicam com as proteínas relacionadas às vias de reparo de DNA (EBERST; BRAHMI; CASSIER, 2017). É importante corrigir o dano antes que a célula se divida, para que a mutação não se propague para as células-filhas (DINANT; HOUTSMULLER; VERMEULEN, 2008). Os *checkpoints* de dano no DNA consistem em vias de transdução de sinal, nas quais as proteínas responsáveis se dividem em quatro grupos principais: sensores, mediadores, transdutores e efetores (LINDSEY-BOLTZ, 2017). Em mamíferos, três quinases da família PIKK (semelhantes a fosfatidilinositol 3-quinases) têm um papel central na ativação dos *checkpoints* de dano ao DNA: ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM and RAD3 related*) e DNA-PKcs (subunidade catalítica da proteína-quinase *DNA*-dependente) (DINANT; HOUTSMULLER;

VERMEULEN, 2008; LIU; LI; LU, 2016).

A DNA-PK é uma quinase envolvida primordialmente na via de reparo da união de extremidade não homóloga (NHEJ), permitindo o reparo de DSBs provocadas tanto por fatores exógenos (radiação ionizante, por exemplo), como também na recombinação de DNA, comum em certos processos fisiológicos (EBERST; BRAHMI; CASSIER, 2017). A ATM e a ATR são dois importantes sensores da lesão ao DNA, a primeira envolvida na detecção de DSBs e a segunda, na detecção de adutos volumosos (LINDSEY-BOLTZ, 2017). Duas quinases *checkpoints*, Chk1 e Chk2, amplificam o sinal de forma a promover a resposta ao dano do DNA. Chk2 é ativada pela ATM, enquanto a Chk1, que já é ativa em células sem perturbações, tem sua atividade aumentada pela fosforilação por ATR. A via ATM-CHK2 ativa os *checkpoints* das fases do ciclo celular G1-S e fase S, principalmente; enquanto a via ATR-CHK1 ativa os *checkpoints* das fases G2-M e S (EBERST; BRAHMI; CASSIER, 2017). A cascata de ativação provoca também a fosforilação da supressora central de tumor p53 e evita sua degradação por proteossomos. A p53, dependendo do estímulo, promove a transcrição de genes que suspendem o ciclo celular, providenciam reparo ao DNA, senescência ou ainda desencadeiam a apoptose (LIU; LI; LU, 2016).

Existem duas vias que levam à apoptose em células de mamíferos: a via intrínseca (regulada por BCL-2) e a via extrínseca (via pelo receptor da morte). A via regulada pela BCL-2 (intrínseca) é ativada por condições estressantes, como privação de citocinas, estresse do retículo endoplasmático ou dano ao DNA. A via extrínseca é ativada pela ligação em receptores do fator de necrose tumoral. A p53 pode atuar tanto na indução da via apoptótica intrínseca, induzindo a transcrição de genes que levarão ao desencadeamento de efetores da morte celular, como também modificando a resposta apoptótica, aumentando a sensibilização a via extrínseca, por exemplo (AUBREY *et al.*, 2017).

Além da apoptose, outros mecanismos de morte celular são conhecidos. A autofagia consiste na acumulação citosólica de autofagossomos, permitindo a degradação e reciclagem de componente celulares. A descoberta de um novo tipo de morte celular, a necroptose, mostrou que a necrose pode ocorrer de uma maneira programada. A necroptose é ativada pela formação de um necrossomo e a permeabilização da membrana plasmática é firmemente regulada. Outros tipos de morte celular são a piroptose e a ferropstose, dependente de ferro. A interação entre organelas e vias podem resultar em diferentes formas de morte celular, dependendo da natureza e intensidade do estímulo e do tipo celular (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

1.3 Vias de reparo do DNA

Vários mecanismos se desenvolveram a fim de se reparar os danos sofridos no DNA. Dependendo do tipo de lesão, diferentes vias de reparo são ativadas. As principais vias em mamífero são: recombinação homóloga (HR), união de extremidades não homólogas (NHEJ), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por excisão de base (BER) e reparo por erro no pareamento - *mismatch* (MMR) (LIU; LI; LU, 2016). Em geral, quebras de dupla fita (DSBs) são reparadas por HR ou NHEJ (NATARAJAN; PALITTI, 2008). Os adutos de DNA e os dímeros de pirimidina são corrigidos por meio do NER. O BER corrige bases danificadas individualmente ou em pequenas quantidades. Os erros no pareamento são corrigidos pelo MMR (LIU; LI; LU, 2016). A Figura 1 apresenta as vias específicas para cada tipo de dano ao DNA e suas proteínas envolvidas.

As principais vias para o reparo de DSBs são HR ou NHEJ. Estas são duas vias distintas, com mecanismos distintos. HR utiliza como base a fita homóloga de DNA, para reparar o dano da quebra da fita. Portanto, HR é predominante na fase S do ciclo celular, quando a cromátide irmã está disponível (Slupphaug *et al.*, 2003). Por contar com o molde da fita irmã a HR é um mecanismo de reparo de DSB livre de erros. O mecanismo começa com uma reação nucleolítica para a formação de uma simples fita (ssDNA) no local da quebra, reação esta mediada pelo complexo MRE11-RAD50-NBS1. O ssDNA é coberto pela RPA, que irá fosforilar a ATM que, por sua vez, irá sinalizar outras moléculas. O ssDNA, no final da DSB, precisa encontrar um locus homólogo doador para a síntese de DNA. A recombinase RAD51 tem um papel central na HR, que orienta o pareamento do ssDNA com a outra molécula de DNA homóloga e intacta. Com a cromátide irmã é possível fazer a síntese de DNA livre de erros (JIN; OH, 2019; SUWAKI; KLARE; TARSOUNAS, 2011; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018). Já foi demonstrado que HR possui um papel importante na recuperação de células sob estresse oxidativo (HAYASHI; UMEZU, 2017).

NHEJ é ativada quando as fitas homólogas não estão disponíveis, e consiste na ligação das fitas rompidas pela DNA Ligase IV (MIKHED *et al.*, 2015). Nesta via, a DSB é reconhecida pelo heterodímero Ku70-Ku80, que irá orientar outras proteínas da via a se acumular no sítio da lesão. As DNA-PKs têm uma alta afinidade pelo complexo Ku-DNA. O complexo DNA-PKs ativa a endonuclease Artemis, que realiza cortes, eliminando o DNA que sobra na extremidade da DSB. As DNA polimerases μ e λ interagem com Ku e são capazes de sintetizar o DNA mesmo sem uma fita molde. Por fim, a ligação das fitas ocorre pela DNA Ligase IV juntamente com XRCC4 (CHANG *et al.*, 2017). NHEJ é ativa por todo o ciclo celular, mas é muito suscetível a erros, podendo exercer um papel predominante na mutagênese induzida por

ROS (SHARMA *et al.*, 2016).

Outra via de reparo de DSB propensa a erros é a via de junção homóloga por microhomologia (MMEJ). Inicialmente considerada como um mecanismo reserva de reparo de quebras de DNA, hoje se sabe que, ao menos durante o desenvolvimento do sistema imunológico, MMEJ tem um papel eficiente na recombinação V(D)J. A via consiste na ligação de microhomologias entre as fitas quebradas, o preenchimento dos gaps por uma DNA polimerase e a ligação dos fragmentos, resultando em deleção ou em deleção seguida de inserção, sendo, por isso, considerada uma via altamente mutagênica (MCVEY; LEE, 2008).

Interessantemente, existem relatos de que retrotransposons, em especial LINE1, podem se integrar em regiões danificadas do DNA, promovendo reparo mediado por retrotransposon. LINE1 junta as duas fitas da DSB ao se inserir no local da lesão de uma maneira independente de endonuclease. Esse tipo de reparo parece competir de alguma forma com NHEJ, já que é menos frequente em células competentes para esta via (MORRISH *et al.*, 2002). Os elementos Alu, não autônomos, também parecem contribuir nas diferentes vias de reparo (White *et al.*, 2015).

A via NER consiste na percepção do dano por proteínas que reconhecem grandes alterações estruturais no DNA, a incisão de um trecho de nucleotídeos, deixando uma lacuna na simples fita que é preenchida pela síntese de novo DNA, e a ligação das extremidades desta fita, restabelecendo a dupla fita de DNA (DOUKI; SAGE, 2016; HU; ADAR, 2017). Mais de 30 proteínas estão envolvidas em reconhecer e verificar a lesão, abrir a dupla hélice, incisão e excisão do trecho danificado, síntese de DNA e ligação. Um dos componentes centrais do NER é a proteína XPA, que tem um importante papel na interação entre o DNA e outros complexos deste sistema de reparo. Duas sub-vias distintas de NER são conhecidas e dependem do reconhecimento inicial da lesão: NER conjugado a transcrição (TC-NER) e NER no genoma global (GG-NER). TC-NER repara o dano em genes ativos, uma vez que está associado ao mecanismo de transcrição, enquanto GG-NER atua para eliminar lesões em todo o genoma (HE; WANG; LIU, 2017).

A via BER é ativada quando há uma modificação tóxica em alguma base específica. Este sistema consiste no reconhecimento da modificação da base por glicosilases, que irão clivar a ligação N-glicosídica entre a base e a deoxirribose, gerando um sítio apurínico ou apirimidínico. Este sítio é processado por endonucleases (especialmente APE-1), deixando livre as extremidades 3' e 5', permitindo a DNA polimerase β e a DNA ligase 1 inserir e ligar a base apropriada (MIKHED *et al.*, 2015).

Se a modificação no DNA não for reparada a tempo, pode levar a erros no pareamento

durante a transcrição. Estes erros são identificados pela maquinaria de reparo da via MMR. (MIKHED *et al.*, 2015). Os principais reguladores de MMR são duas famílias de enzimas: MutS (entre elas MSH2, MSH6, MSH3), que reconhece erros de pareamento base a base e pequenos loops de inserção/deleção; e Mut L (como MLH1 e MLH6), que detecta loops maiores. Após o reconhecimento, estas enzimas desencadeiam a cascata de reparo, que contém várias enzimas que irão retirar os nucleotídeos incorretos e acrescentar os corretos, e ligar as regiões flanqueadoras (BRIDGE; RASHID; MARTIN, 2014; MIKHED *et al.*, 2015). Diversas evidências demonstram que MMR tem papel importante na recombinação homóloga, recombinação mitótica e meiótica, reparo de DSB, troca de classe de imunoglobulina, dentre outros (BRIDGE; RASHID; MARTIN, 2014). O MMR pós-replicativo promove estabilidade genética ao reparar erros na replicação, inibindo recombinação entre sequências de DNA não idênticas e participando em respostas ao dano induzidos por agentes genotóxicos como cisplatina, e lesões oxidativas como 8-oxoG (CAMPOS *et al.*, 2011a).

Algumas vezes, o reparo do DNA é incompleto, com um dano refratário ao reparo ou com uma extensão de lesão muito grande. A persistência de lesões no DNA pode obstruir a replicação celular, levando a morte. Mecanismos de tolerância celular, como a síntese translesão (TLS), são necessários para manter a sobrevivência celular. A TLS consiste em uma família conservada de polimerases capazes de ignorar as lesões durante a síntese de DNA (VAISMAN; WOODGATE, 2017). São conhecidas cerca de 11 polimerases TLS: REV1, POL η , POL ι , POL κ , POL ζ , POL μ , POL λ , POL β , POL ν , POL θ (CHATTERJEE; WALKER, 2017), que são capazes de ignorar vários tipos de lesões como dímeros de pirimidina, pequenos adutos de cisplatina, 8-oxoG, entre outras (YANG; GAO, 2018).

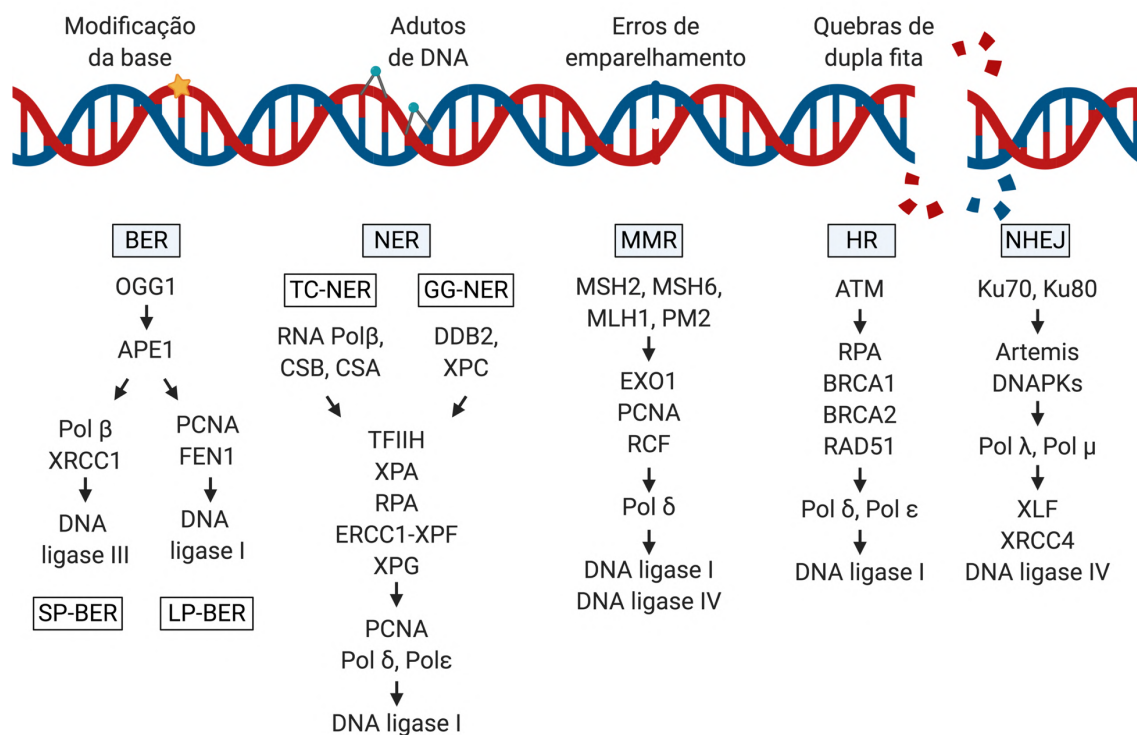


Figura 1. Danos ao DNA e vias de reparo de células de mamífero. Bases modificadas, como 8-oxoG, são reparadas pela via BER, que se dividem em dois tipos: SP-BER e LP-BER. Adutos de DNA, como lesões causadas por cisplatina, são reparados pela via NER, que pode ser TC-NER ou GG-NER. Erros de pareamento de bases são reconhecidos e reparados pela via MMR. Quebras de dupla fita podem ser reparadas pela via HR, livre de erros, ou pela via NHEJ, propensa a erros.

1.3.1 Agentes genotóxicos e tipos de lesões no DNA

Um dos principais fatores de dano no DNA é o estresse oxidativo. Ele pode ser causado por fatores endógenos, frutos do próprio metabolismo celular, produzidos como consequência da respiração oxidativa na mitocôndria, também como sistema de defesa a patógenos em células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos e algumas células epiteliais), e até como moléculas sinalizadoras. Fatores externos como infecções, radiação UV, consumo de álcool e fumo também aumentam o estresse oxidativo (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; MARKKANEN, 2017). O dano no DNA por estresse oxidativo compreende danos oxidativos às bases e quebras nas fitas de DNA (DSB). As DSB, se não reparadas, podem ser letais, enquanto danos às bases podem ser mutagênicos e/ou citotóxicos.

Os danos às bases são causados pela reação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical peróxido ($\text{OH}\cdot$) e radical hidroxil (O_2), com o DNA. Mais de 20 tipos de danos às bases já foram identificados, sendo o mais prevalente a purinas o 7,8-dihidro-8-oxoguanina, também conhecido por 8-oxoguanina ou 8-oxoG, e a pirimidinas, a formação de timina-glicol (Tg)

(SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003). O DNA mitocondrial também é um importante alvo de dano por estresse oxidativo e, se não for reparado, pode levar à desregulação mitocondrial e morte celular (VAN HOUTEN; WOSHNER; SANTOS, 2006a).

A primeira linha de defesa contra ROS é a inativação enzimática do superóxido pela superóxido desmutase e inativação do peróxido de hidrogênio pela catalase. A segunda linha de defesa consiste na hidrólise de nucleotídeos oxidados por enzimas específicas. A terceira linha de defesa é o reparo do dano no DNA por uma rede de mecanismos de reparo, como, MMR, HR, NHEJ, BER, sendo esta última a principal via de reparo para o dano oxidativo (SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003). De interesse, se a modificação no DNA não for reparada a tempo, pode levar a erros no pareamento durante a transcrição. Estes erros são identificados pela maquinaria de reparo da via MMR. (MIKHED *et al.*, 2015).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido naturalmente no organismo, e sua concentração fisiológica é de aproximadamente 10nM. O H_2O_2 reage de forma relativamente lenta com outras moléculas, podendo se difundir para atingir alvos a uma certa distância, sendo um componente central da sinalização redox. São as concentrações suprafisiológicas (>100nM) que levam danos a biomoléculas. Esta molécula atravessa as membranas celulares de forma mais rápida por meio de aquaporinas, que são canais de água (SIES, 2017; SIES; BERNDT; JONES, 2017). O H_2O_2 não lesiona o DNA diretamente, mas atua como um doador de radicais livres. Quando o H_2O_2 reage com um íon metal dentro da célula, tal como Fe^{2+} ou Cu^+ , são produzidos radicais $OH\bullet$ que podem reagir com o DNA e levar a lesões como sítios AP (apurínico/apirimidínico), oxipirimidinas, oxipurinas, lesões de simples fita (SSB) e lesões de dupla fita (DSB). As vias de reparo essenciais para que a célula tolere o dano oxidativo são as vias BER, HR, NHEJ e TLS (FRANKENBERG-SCHWAGER *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que o peróxido de hidrogênio causa danos em outras moléculas além do DNA, e muitas enzimas, inclusive de reparo, podem ser inativadas por ROS (FRANKENBERG-SCHWAGER *et al.*, 2008; JARRETT; ALBON; BOULTON, 2006; MIKHED *et al.*, 2015). O RNA também é objeto de oxidação. Algumas modificações oxidativas em microRNA-184 permite que se ligue mRNA de proteínas Bcl-xL, Bcl-w, impedindo sua tradução, em linfoma de células B, impedindo a apoptose (SIES, 2017; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Outros fatores externos podem levar a lesões ao DNA. De interesse para nosso estudo, a cisplatina, também conhecida por cis-diaminodicloroplatina, é um composto comumente utilizado como droga antitumoral. A cisplatina atua como um agente alquilante, provocando

ligações cruzadas entre nitrogênio de purinas, reagindo principalmente com guanina (NOLL; MCGREGOR MASON; MILLER, 2006; ROCHA *et al.*, 2018). Agentes de ligações cruzadas interfitas (*interstrand crosslinking agents* - ICL), como a cisplatina, formam adutos covalentes às bases nitrogenadas envolvendo ambas as fitas de DNA, ligando as duas fitas. Estes adutos impedem a separação entre as duas fitas, paralisando a forquilha de replicação, bloqueando tanto a transcrição como a replicação do DNA. Como consequência, este bloqueio leva à formação de DSBs. Os ICLs são reparados por uma combinação de NER e HR. O ICL é removido por proteínas da via NER, e a DSB reparada por recombinação homóloga (MIYAGAWA, 2008; ROCHA *et al.*, 2018). A Figura 2 apresenta os tipos de danos causados por H₂O₂ e por cisplatina no DNA.

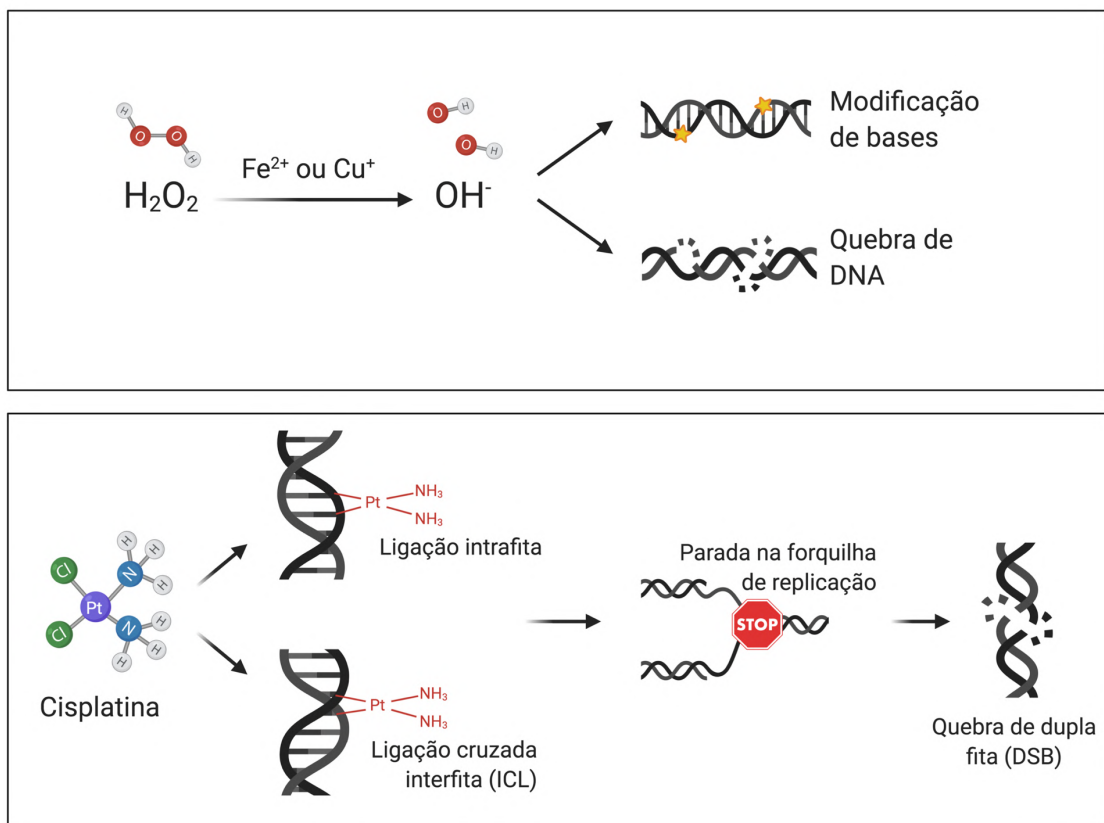


Figura 2. Lesões ao DNA por agentes genotóxicos. Painel superior: o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ao reagir com íons de ferro ou de cobre, liberam radicais livres de oxigênio. O radical OH⁻ provoca modificação de bases nitrogenadas e também pode provocar quebra de simples e dupla fita. Painel inferior: a cisplatina é capaz de interagir com as bases do DNA criando ligações intrafitas e interfitas (ICL) que, na replicação, pode levar à quebra de dupla fita pela parada na forquilha de replicação.

Infecções por diversos tipos de patógenos também podem causar danos ao DNA. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estima que cerca de 18% dos cânceres do mundo são devido a doenças infecciosas. Diferentes agentes infecciosos, como vírus (HPV,

HBV, HCV, EBV), bactérias (*Helicobacter pylori*), e outros parasitos (*Schistosoma haematobium* e *Opisthorchis viverrini*) são considerados carcinogênicos grupo I pela IARC. A infecção por esses agentes leva ao acúmulo de 8-nitroguanina e 8-oxoG no genoma, que podem ser induzidas por ROS e RNS produzidos durante a inflamação (KAWANISHI *et al.*, 2017). A infecção é capaz de provocar uma inflamação crônica que resulta na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por células imunológicas e epiteliais do hospedeiro (MURATA, 2018), e alguns patógenos, como as bactérias do gênero *Enterococci*, são capazes de gerar radicais OH⁻ que podem causar mutações pontuais e quebras de dupla fita (GAGNIÈRE *et al.*, 2016). Outras toxinas secretadas por bactérias, como a colibactina, toxina Shiga, toxina distensora citoletal (CDT), toxinas de *Bacteroides fragilis* (BFT), e endonucleases incitam dano ao DNA com indução de DSB (ELSLAND; NEEFJES, 2018; GAGNIÈRE *et al.*, 2016; ŽGUR-BERTOK, 2013). Experimentos com modelos murinos demonstraram que o *Trypanosoma cruzi* pode ser um agente genotóxico em células cardíacas, ao induzir extensos danos ao DNA de cardiomiócitos. A infecção por *T. cruzi* também induz dano ao DNA de células do baço. Sabe-se que o parasito é capaz de induzir estresse oxidativo, e provavelmente a produção de óxido nítrico pela inflamação tem um papel no dano ao DNA (RIBEIRO *et al.*, 2007).

1.3.2 Falha no Sistema de Reparo e a proliferação celular descontrolada

Como explicado anteriormente, a integridade do genoma e o crescimento e sobrevivência celular são controlados por inúmeras vias que envolvem *checkpoints* do ciclo celular, morte celular programada e reparo de DNA (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). Quando ocorre uma falha no reparo do DNA, as alterações genômicas decorrentes podem produzir mudanças na fisiologia celular que levam a um processo de proliferação celular descontrolada (tumores). Nessas situações, é comum a perda funcional de uma ou mais vias de reparo de DNA e a maior parte das células que se multiplicam em excesso apresentam centenas a milhares de aberrações genômicas que as distinguem das células normais. A carga mutacional varia entre os tipos celulares e pode ir de uma a várias mutações por megabase. Em vários tipos de tumores, o tipo de deficiência no reparo já foi caracterizado, por exemplo: mutações em BRCA1/BRCA2 estão associadas a tumores de mama, ovário, próstata etc e estes genes são relacionados à via HR; o comprometimento da via NER pode levar a alguns tipos de câncer de ovário ou bexiga, e também câncer de pele; no câncer colorretal e endometrial, é comum uma deficiência na via MMR (MOUW, 2017); cânceres renais têm sido associados com mutação em OGG1, enzima do BER. Poucos defeitos em elementos da via NHEJ têm sido associados

com câncer, entre eles a mutação de Ku70 em câncer de mama, colorretal e de pulmão, e DNA PKs, ligase IV e XRCC4 associados com glioma (CURTIN, 2012).

Diversas evidências apontam que a via MMR tem um papel importante no combate à carcinogênese, provavelmente devido a um acúmulo de mutações quando esta via está ausente. O fenômeno conhecido por instabilidade de microssatélites (MSI), onde sequências microssatélites se tornam instáveis e aumentam ou diminuem, é comum no caso de perda MMR (RYAN *et al.*, 2017). Tumores deficientes em MMR possuem uma taxa de mutação de 100 a 1000 vezes maior que células normais. Essa relação entre MMR e câncer provavelmente está ligada aos danos de estresse oxidativo comum em células tumorais (BRIDGE; RASHID; MARTIN, 2014).

O reparo de DSBs também é um importante mecanismo de supressão de tumor. Mutações em ATM e BRCA1/2, importantes na HR, aumentam o risco de susceptibilidade ao câncer (CHOI; KIPPS; KURZROCK, 2016). A preferência pelo reparo via NHEJ durante a fase S promove instabilidade genômica e câncer. Observações recentes sugerem que MMEJ pode promover translocações cromossômicas oncogênicas relacionadas com câncer humano (APARICIO; BAER; GAUTIER, 2014).

Ainda vale ressaltar o papel da p53, um regulador chave que controla tanto a morte celular como a estabilidade do genoma, permitindo uma ligação estreita entre esses dois processos (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). Mutações na p53 podem levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (LUIJSTERBURG; VAN ATTIKUM, 2011).

1.4 Senescência celular

Além da morte celular, outro mecanismo para prevenir a proliferação celular descontrolada em mamíferos é a senescência, que é quando ocorre uma parada no ciclo celular. Diferentemente da quiescência, a parada no ciclo de células senescentes é irreversível, e não há diferenciação funcional e morfológica como em células que entraram em diferenciação terminal. Mesmo sem replicar, as células senescentes são metabolicamente ativas e normalmente desempenham as mesmas funções das células das quais elas derivaram (HE; SHARPLESS, 2017). A parada na proliferação de células anteriormente replicativas normalmente é desencadeada por uma resposta ao dano de DNA persistente ou à sinalização de estresse. A resposta ao dano de DNA conduzirá a célula a diferentes possíveis resultados, como parada transitória do ciclo celular e reparo de DNA, apoptose, diferenciação ou ainda a senescência celular (MATT; HOFMANN, 2016). A senescência é estabelecida e mantida por duas vias principais de supressão de tumor: a via p53/p21 e a via p16/RB (CAMPISI, 2013).

No entanto, ela pode ser revertida por outros eventos oncogênicos (HE; SHARPLESS, 2017). Assim, além da parada no ciclo celular, as principais marcas de um fenótipo senescente são o dano macromolecular, fenótipo secretório e metabolismo desregulado.

Uma outra característica marcante de células senescentes é o aumento da atividade de beta-galactosidase lisossomal, bem perceptível pelo aumento em tamanho e número dos lisossomos nessas células, as quais também apresentam focos persistentes de dano ao DNA denominados DNA-SCARSs. Estudos mostram que as mitocôndrias das células senescentes também são menos funcionais que nas células não senescentes (GORGOU LIS *et al.*, 2019). Na cultura celular, a senescência é normalmente acompanhada por mudanças morfológicas significativas: células senescentes se tornam achatadas, aumentadas, e vacuolizadas, e algumas vezes aparecem com múltiplos núcleos, ou um núcleo aumentado. *In vivo*, as células senescentes normalmente preservam a morfologia por conta da arquitetura tecidual (HERRANZ; GIL, 2018).

É importante ressaltar que a senescência não é só uma resposta do organismo contra o desenvolvimento de tumor, mas tem diferentes funções no organismo. Durante o desenvolvimento embrionário, células senescentes têm um papel importante na organogênese. Esta senescência, no entanto, não depende de p53 ou p16, mas é mediada por p21 (HE; SHARPLESS, 2017). A senescência também é uma das maiores causas do envelhecimento e está associada a vários fenótipos degenerativos associados ao envelhecimento, como aterosclerose, osteoporose, diabetes tipo 2 e possivelmente glaucoma (CALCINOTTO *et al.*, 2019; CAMPISI, 2013). Também existem relatos do papel de células senescentes no reparo a feridas e no sistema imunológico (CALCINOTTO *et al.*, 2019).

Ademais, a senescência também pode ser induzida por dano ao DNA em situações de estresse ambiental ou infecção/inflamação crônica. Infecções por HCMB, HPV, HBV, HCV e coinfeção de HCV/HIV já foram relatadas como possíveis indutores de senescência celular. Sabe-se também que o LPS e outras toxinas bacterianas, como a colibactina de *E. coli*, também estão envolvidas nesse processo. Entretanto, os papéis da infecção bacteriana e viral na indução da senescência ainda é bastante desconhecido (WEI; JI, 2018). Entre os protozoários, há relatos, por exemplo, de que *Plasmodium falciparum* e *Leishmania braziliensis* aceleram o processo de senescência de células T (COVRE *et al.*, 2019; FRIMPONG *et al.*, 2019), e também de que a infecção por *T. cruzi* pode induzir um fenótipo senescente em fibroblastos murinos (GUIMARÃES-PINTO *et al.*, 2018).

2 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, um parasito hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, é o agente etiológico da Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana. Estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, maior parte na América Latina, mas já há muitos casos extra-continentais, decorrentes principalmente da migração (WHO, 2017). A principal forma de transmissão desse protozoário é a vetorial, pelo inseto hematófago triatomíneo, popularmente conhecido por barbeiro, mas também pode ser transmitido por via congênita, oral ou por transfusão de sangue/ transplante de órgãos (PIERROTTI *et al.*, 2018).

A Doença de Chagas apresenta duas fases clínicas principais: a aguda, quase sempre assintomática e marcada por uma alta parasitemia, e a crônica, com baixa parasitemia e que pode compreender os sintomas mais graves como cardiomegalia, megacólon e megaesôfago. Estima-se que 30% dos pacientes desenvolvem problemas cardíacos na fase crônica, e de 15 a 20% apresentam alteração na motilidade, secreção e absorção no trato digestivo (PIERROTTI *et al.*, 2018). As drogas utilizadas para o tratamento são o benzonidazol e o nifurtimox; no entanto, ambas apresentam baixa efetividade na fase crônica da infecção e significativas reações adversas, considerando-se assim que não existe um tratamento adequado para a doença na sua forma avançada (ALDASORO *et al.*, 2018).

Os mecanismos patogênicos da Doença de Chagas ainda não estão completamente elucidados. Duas teorias principais figuram entre os especialistas: a persistência do parasito (GUTIERREZ *et al.*, 2009; TARLETON; ZHANG, 1999) e a autoimunidade (BONNEY; ENGMAN, 2008; SANTOS-BUCH; TEIXEIRA, 1974; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Apesar de distintas, tais teorias não são excludentes. Wesley *et al* (2019) sugerem uma teoria integrativa, associando carga parasitária, transferência horizontal de kDNA e reação inflamatória. Análises de correlação em camundongos infectados revelaram a associação entre a carga parasitária no coração e no intestino com a produção de autoanticorpos contra proteínas cardíacas, enquanto parasitemia na medula óssea estava associada com o processo inflamatório do coração e do intestino, sugerindo uma modulação da resposta imune pelo parasito. (WESLEY *et al.*, 2019).

O *T. cruzi* possui uma diversidade genética com várias cepas que variam em infectividade, tropismo de tecido, plasticidade do genoma, resistência ao estresse, entre outras coisas. A classificação atual agrupa os isolados em seis unidades discretas de tipagem (DTU): de I a VI (ZINGALES, 2017). Sabe-se que várias DTUs podem coexistir no mesmo vetor e também num mesmo hospedeiro. TcI está frequentemente associado ao ciclo selvático, mas também é frequente em ciclos domésticos e é responsável pela transmissão da doença de Chagas no norte da bacia amazônica. Possui uma distribuição mais ampla, desde o sul dos EUA até o norte da

Argentina e Chile. TcII, TcV e TcVI estão mais associados com ciclos domésticos e estão envolvidos na transmissão da doença em países do cone sul e Bolívia. TcV e TcVI têm uma origem híbrida com TcI e TcII. TcIII e TcIV estão relacionados com ciclos selváticos em florestas tropicais. Diferenças entre as cepas também são percebidas em relação ao processo infeccioso. Por exemplo, experimentos *in vitro* mostraram que, embora parasitos da TcI infectem inicialmente mais cardiomiócitos que TcII, os últimos se proliferam intracelularmente de forma mais eficiente (ANDRADE *et al.*, 2010). Igualmente, modelos experimentais apresentam que TcII apresenta maior parasitismo no sangue (SALES-CAMPOS *et al.*, 2015) e maior prevalência na infecção de coração de BALB/c que TcI (ANDRADE *et al.*, 1999).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida heteróxico, alternado em dois hospedeiros diferentes: um invertebrado, que é o triatomíneo vetor, e o hospedeiro vertebrado, normalmente mamíferos. No inseto vetor, as formas evolutivas presentes são a forma replicativa epimastigota e a forma infectiva tripomastigota metacíclica. No hospedeiro vertebrado, as formas evolutivas são a tripomastigota sanguínea e a amastigota, forma intracelular e replicativa (KESSLER *et al.*, 2017). Durante o repasto sanguíneo, formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas junto com as fezes do inseto, e infectam o hospedeiro vertebrado por meio da lesão da picada, feridas na pele ou pelas membranas conjuntiva/mucosa. Os parasitos, ao entrar na célula, se diferenciam em amastigotas, proliferam, diferenciam-se em tripomastigotas e saem por lise celular. As formas tripomastigotas circulantes poderão infectar novas células, espalhando a infecção pelo corpo e, eventualmente, pode ser ingerida pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo (KESSLER *et al.*, 2017). A Figura 8 apresenta o ciclo de vida do *T. cruzi*, juntamente com os possíveis danos ao DNA do parasito e os sintomas da Doença de Chagas.

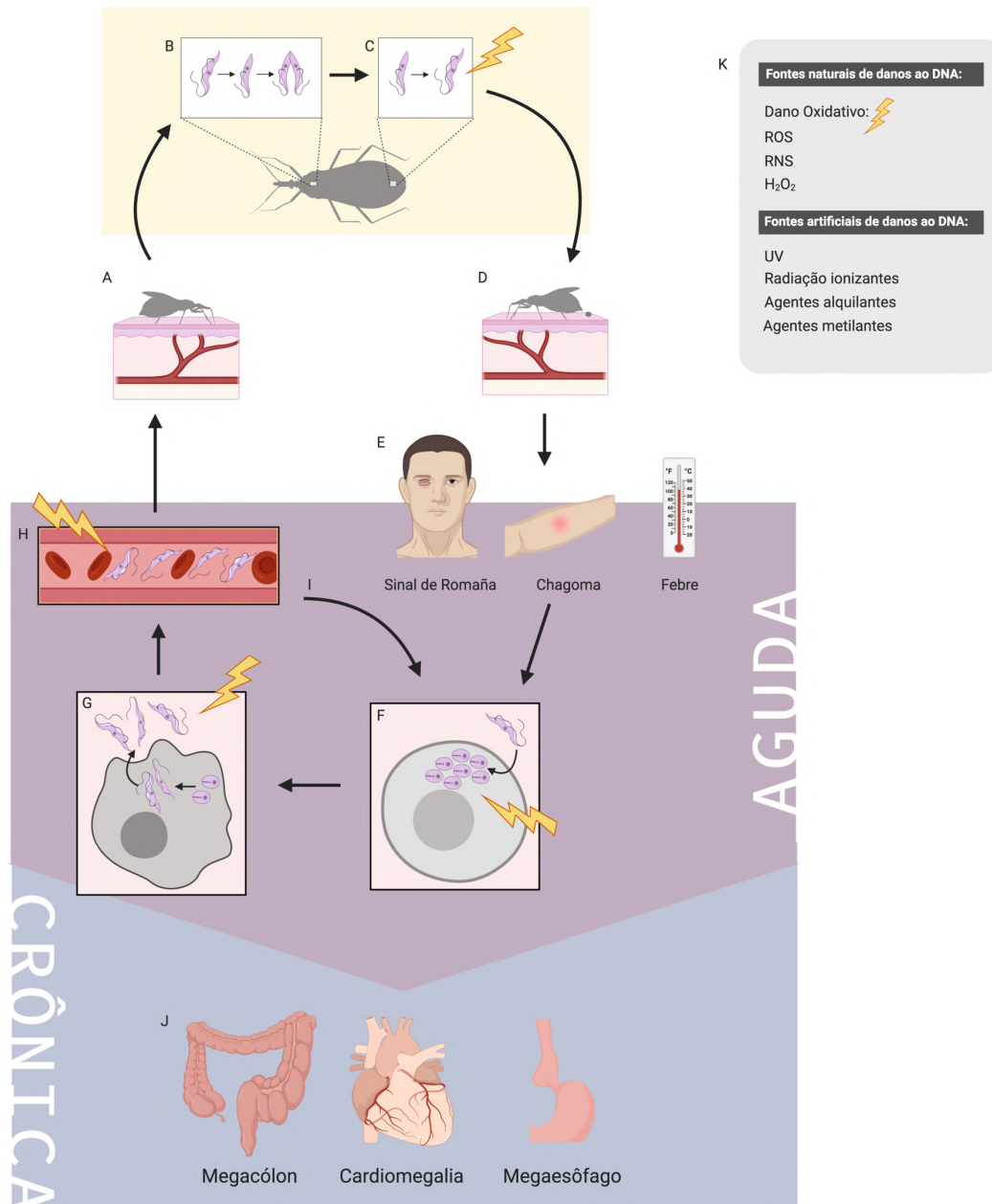


Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e exposição a fatores genotóxicos. Quando formas tripomastigotas do *T. cruzi* são inoculadas no hospedeiro invertebrado após o repasto sanguíneo (A), tais formas se diferenciam em epimastigotas e se replicam no intestino anterior do triatomíneo (B). Ao alcançarem a porção posterior do trato digestivo do inseto, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (C) e são excretadas junto com as fezes do barbeiro (D). Os tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro vertebrado, como o ser humano, via feridas ou pela mucosa, e pode causar sintomas agudos (E). Após a entrada nas células, os parasitas se diferenciam na forma replicativa amastigota (F), que após proliferação, se diferenciam em tripomastigotas que saem por lise celular (G) para a corrente sanguínea (H). Os tripomastigotas sanguíneos podem invadir novas células ou infectar um hospedeiro intermediário durante o repasto sanguíneo. Os pacientes podem evoluir para a fase crônica da doença, podendo desenvolver cardiomegalia, megacólon e megaesôfago (J). Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* pode sofrer diferentes estímulos que causam lesões ao DNA (K). Adaptado de Rose *et al*, 2020.

2.1 O sistema de reparo de DNA do *Trypanosoma cruzi* e sua importância na relação parasito-hospedeiro

Ao longo de seu ciclo de vida, o principal dano ao DNA que o parasito sofre é o estresse oxidativo (Figura 3K). Sendo uma estratégia importante do sistema imunológico no combate a patógenos, espécies reativas podem, dependendo da concentração, ser tanto prejudiciais como benéficas para a biologia do *T. cruzi*, contribuindo para a morte do parasito ou ainda, atuar como um estímulo de sinal e indutor de proliferação do parasito (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). A resposta oxidativa ao patógeno pode também prejudicar o hospedeiro. Uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, acaba por causar danos ao DNA tanto da célula quanto do agente infeccioso. Tal interação danosa pode ser observada nas infecções pelo *T. cruzi*, onde as três formas celulares deste protozoário (do hospedeiro invertebrado e do vertebrado) estão sob constante ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS) ao longo de todo seu ciclo de vida (CABRERA *et al.*, 2011).

O *T. cruzi* não possui a enzima catalase, uma das principais enzimas na primeira linha de defesa contra H₂O₂ em eucariotos (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016a). Assim, a maquinaria de reparo de DNA do *T. cruzi* exerce um papel central para promover resistência ao estresse oxidativo. Uma das vias principais contra dano oxidativo, em especial no reparo a bases modificadas, como 8-oxoG, é a via BER. Esta via está ativa no parasito e diversos genes já foram identificados em seu genoma, inclusive DNA glicosilases, AP endonucleases, e DNA Polimerase beta, apenas na mitocôndria (CABRERA *et al.*, 2011; KUNRATH-LIMA *et al.*, 2017; PÉREZ *et al.*, 1999). Ainda há especulações sobre que polimerase participaria da BER no DNA nuclear, alguns pesquisadores sugerem que seriam polimerases tipo δ (PEÑA-DIAZ *et al.*, 2004). Diversos estudos sugerem que a via MMR seria uma alternativa à via BER no controle de níveis de 8-oxoG (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016b). A via MMR também tem um papel importante na criação de diversidade genética do parasito, característica essencial para evasão do sistema imune (CAMPOS *et al.*, 2011a; MACHADO *et al.*, 2006).

Uma das enzimas centrais da via MMR, a MSH2, possui particularidades no *T. cruzi*. O parasito apresenta apenas uma cópia de TcMSH2 em seu genoma (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2001) e foram detectados diferentes polimorfismos, que a separam em três haplogrupos: A, B e C. O haplogrupo A corresponde à linhagem *T. cruzi* I, o haplogrupo C corresponde à linhagem II e haplogrupo B é pertencente a um terceiro grupo com características híbridas. O mesmo estudo demonstrou que este polimorfismo resulta em diferenças na eficiência do MMR, sendo que os haplogrupos B e C têm a habilidade de MMR reduzida (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003). Portanto, cepas pertencentes à linhagem I possuem um MMR mais eficaz que cepas da

linhagem II (que experimentalmente mostra-se mais infectiva). Ademais, os níveis de transcrição de TcMSH2 parecem ser maiores nas formas amastigotas e epimastigotas (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2006). Quando tratadas com drogas modificadoras de DNA, como a cisplatina, as cepas com MMR mais eficiente (Tc I) são mais sensíveis à droga, já que as proteínas da via MMR podem atuar como transdutores de sinal de dano celular, desencadeando mecanismos de iniciação de morte celular. Além da proteção do DNA genômico, evidências sugerem que atividade MMR no *T. cruzi*, especialmente da proteína TcMSH2, tem um importante papel na proteção do DNA mitocondrial contra o dano oxidativo (CAMPOS *et al.*, 2011a).

A via NER, responsável pelo reparo de lesões que alteram a conformação tridimensional do DNA (como adutos de cisplatina), aparentemente está presente em tripanossomatídeos, já que a maioria dos seus componentes estão contidos em seu genoma. No entanto, os mecanismos desta via apresentam algumas diferenças se comparado a eucariotos superiores, como, por exemplo, a ausência de XPA, sendo mais similar ao reparo de *Plasmodium falciparum* e plantas (PASSOS-SILVA *et al.*, 2010).

Embora na maior parte dos organismos a HR seja a via preferida para o reparo de DSBs, no *T. cruzi* outra via, propensa a erros, tem sido mais observada nesse tipo de reparo. A junção de extremidades por micro-homologia (MMEJ) parece ser o mecanismo primário no reparo de DSBs no *T. cruzi*, onde a via NHEJ está aparentemente ausente (PENG *et al.*, 2015). É interessante ressaltar que, em vertebrados, a via MMEJ é a principal responsável pela indução de mutagênese no reparo de DSBs (SEOL; SHIM; LEE, 2018). A via HR, no entanto, ainda está presente no *T. cruzi*. TcRad51, componente chave da maquinaria de HR, é expressa em todas as formas de ciclo de vida do parasito, sendo mais expressa em amastigotas (REGIS-DAS-SILVA *et al.*, 2006).

Outros mecanismos de reparo presentes no *T. cruzi* incluem os mecanismos diretos: alquilação reversa e reparo de dano oxidativo, e a chamada síntese translesão (TLS), um mecanismo propenso a erros que permite que a célula tolere a lesão, escapando da morte celular. Um aumento na expressão de proteínas da TLS foi registrado na resistência do *T. cruzi* a H₂O₂ (PASSOS-SILVA *et al.*, 2010). Entre estas proteínas, está a TcPolk, presente no cinetoplasto, e a TcPolη, presente no núcleo. Essas polimerases são responsáveis por ignorar lesões como dímeros de pirimidina, 8-oxoG e adutos de cisplatina (DE MOURA *et al.*, 2009; RAJÃO *et al.*, 2009; ROSE; CARVALHO; HECHT, 2020).

Investigações sobre o sistema de reparo do parasito têm trazido perguntas sobre como a resposta ao dano do DNA interfere no metabolismo do parasito. Diversas pesquisas apresentam

um estado de dormência do parasita após lesões causadas por benzonidazol, radiação gama e MMS, com papel da enzima Rad51 neste último (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020). Interessantemente, alterações no metabolismo do *T. cruzi* também podem afetar a sobrevivência da célula hospedeira (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020). Alguns estudos apontam que o *T. cruzi* é capaz de interferir no ciclo celular do hospedeiro e muitos genes relacionados ao metabolismo do DNA, incluindo BER e MMR, como DNA polimerase POLK e POLB, DNA helicase RECQL e DNA glicosilase SMUG1, os quais são mais expressos com a infecção do parasito (COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009). Evidências experimentais mostram que o parasito reprograma vários genes em células epiteliais, envolvidos em resposta ao estresse, fatores de transcrição e metabolismo (CHIRIBAO *et al.*, 2014). Também há indícios de que a infecção induz DSB em cardiomiócitos, ativação da via BER da célula hospedeira, e indução de apoptose em alguns tipos celulares, e citoproteção em outros (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020). Ainda há, no entanto, muitas lacunas a serem preenchidas sobre como o parasita interfere no reparo celular e contribui na decisão do destino da célula.

II. Justificativa

Diversas evidências apontam para a influência da infecção do *T. cruzi* no metabolismo da célula hospedeira, incluindo o metabolismo de DNA. Entretanto muito ainda necessita ser elucidado. Neste contexto, a diversidade genética do *T. cruzi*, representada por diversas cepas com infectividade e eficiências de reparo de DNA diferentes, é característica relevante a ser considerada no processo de compreensão do cenário natural das infecções pelo protozoário. Ademais, saber como o reparo de DNA do conjunto parasito-hospedeiro se comporta frente a situações de estresse ambiental, como estresse oxidativo ou presença de agentes genotóxicos, nos permite obter uma perspectiva ecológica e evolutiva sobre o assunto.

Visando uma aplicação mais direta, compreender o papel da infecção na regulação do reparo celular ajudará a estabelecer elementos centrais da relação parasito-hospedeiro, possibilitando a identificação de alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, uma doença sem tratamento efetivo, bem como a identificação de proteínas específicas do *T. cruzi* capazes de inibir a proliferação celular descontrolada, as quais poderiam ser testadas contra tumores. Portanto, a investigação terá relevância social à medida que pode agregar conhecimentos que interessam à saúde do indivíduo infectado com o *T. cruzi*.

III. Objetivos

1. Objetivos Gerais

Verificar a influência do *Trypanosoma cruzi* no sistema de reparo de DNA e na viabilidade das células hospedeiras.

2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a infecção pelo *T. cruzi* causa dano ao DNA e altera a expressão de genes das vias de reparo da célula hospedeira;
- Determinar se o *T. cruzi* afeta a taxa de proliferação da célula hospedeira;
- Avaliar se a infecção pelo *T. cruzi* resulta em senescência da célula hospedeira;
- Verificar o papel da infecção pelo *T. cruzi* sobre as vias de reparo de DNA do hospedeiro;
- Investigar se a variabilidade genética do *T. cruzi* tem influência sobre o reparo de DNA, proliferação e senescência da célula hospedeira;
- Determinar se o *T. cruzi* altera o funcionamento das vias de reparo de DNA e a proliferação de células submetidas a agentes genotóxicos.

IV. Metodologia

1 Cultivo de células

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem de mioblasto de rato L6. As culturas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) a pH 7.2, e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 72 h e o repique das células, uma vez por semana. Ao se observar alta densidade das células e a formação da monocamada com mais de 80% de confluência, a camada de células foi suspensa por tripsinização. As células suspensas foram homogeneizadas e 1 mL da suspensão colocado em novo frasco de cultura de 25cm³, acrescido de 4 mL de meio DMEM 5%.

2 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* das linhagens Berenice e Colombiana foram mantidas em meio LIT 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, a 25°C. Os repiques foram realizados a cada 15 dias.

Formas tripomastigotas das mesmas linhagens, com duas passagens em camundongos BALB/c para aumentar a infectividade, foram mantidos em cultura com células L6, cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) a pH 7.2, e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O sobrenadante foi coletado para obtenção das formas tripomastigotas e centrifugado a 300g.

3 Infecção por *Trypanosoma cruzi*

A infecção foi realizada inoculando-se formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cada poço contendo células L6 previamente crescidas. O número de formas tripomastigotas foi obtido por contagem em Câmara de Neubauer, tendo sido inoculado 5 vezes mais parasitos com relação ao número de células do tecido. A infecção se deu por 72h. Os controles não infectados foram inoculados com meio DMEM 5% SFB.

4 Detecção de parasitemia

Após 72h de infecção, a proporção de células parasitadas foi detectada por três metodologias distintas:

4.1 A fresco

Após o intervalo de tempo determinado, as culturas infectadas com *T. cruzi* Berenice e Colombiana foram analisadas em microscópio invertido. Foram escolhidas aleatoriamente 100 células e calculada a proporção de células infectadas com ninhos de amastigota. O experimento foi feito em triplicata.

4.2 Lâminas coradas com Giemsa

Após 72h de infecção, células crescidas em lamínula redonda foram fixadas em metanol e coradas com corante Giemsa 5% por 5 minutos. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e foram escolhidas aleatoriamente 100 células para calcular a proporção entre infectadas e não infectadas com formas amastigotas do parasito. O experimento foi feito em triplicata.

4.3 Coloração PKH26

A membrana plasmática de formas tripomastigotas de *T. cruzi* Berenice e Colombiana foi corada com PKH26 (Sigma-Aldrich), segundo instruções do fabricante. Após sucessivas lavagens, foram inoculadas 5x formas tripomastigotas coradas em células L6. Passadas as 72h de infecção, as células foram tripsinizadas e analisadas por citometria de fluxo (Attune™ NxT, Thermo Fisher Scientific). Células positivas para fluorescência vermelha (canal BL-2 574/26) foram consideradas infectadas com formas amastigotas, e confirmou-se por microscopia de fluorescência (Olympus BX51). O experimento foi feito em triplicata. A Figura 4 esquematiza este protocolo.

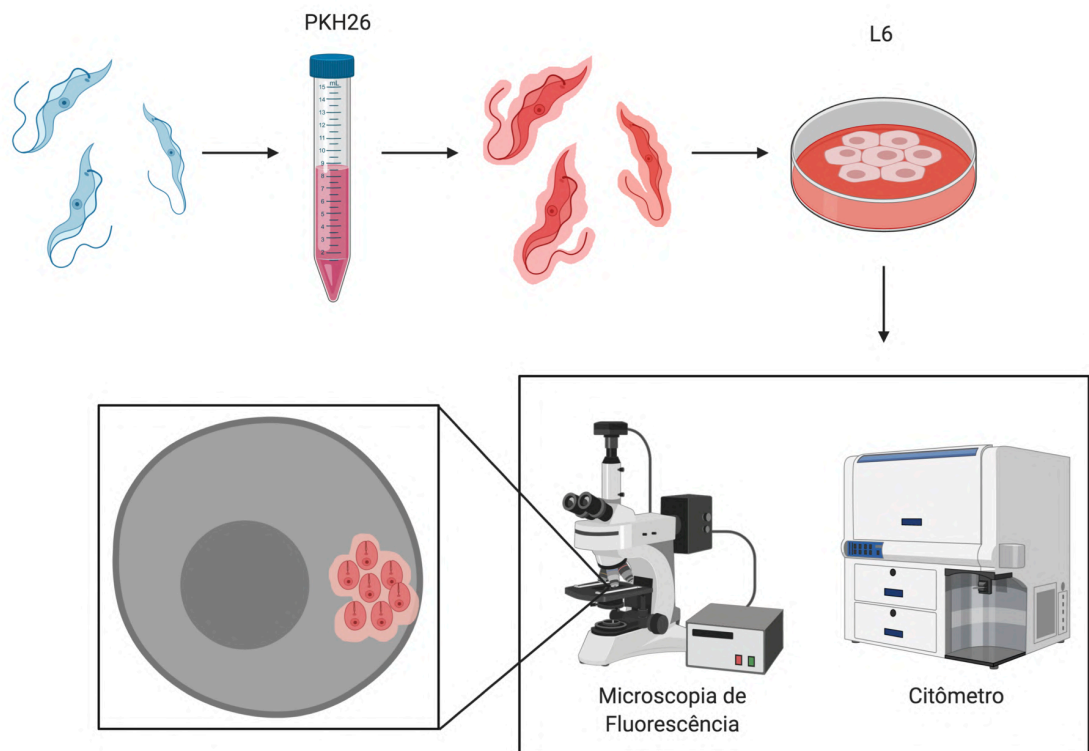


Figura 4. Protocolo de parasitemia pela coloração de PKH26. Formas tripomastigotas são previamente coradas com PKH26, devidamente lavadas e uma quantidade 5X é inoculada em cultura de células L6. Após 72h, as células são coletadas e analisadas por citometria de fluxo para determinação de quantidade de células infectadas. A infecção também foi confirmada por microscopia de fluorescência.

5 Tratamento com Cisplatina

Células L6 (5×10^4 células) foram semeadas em placas de 24 poços. O tratamento com cisplatina se deu 72h após a infecção com *T. cruzi*, expondo-se as células a meio DMEM acrescido de diferentes concentrações de cisplatina (de $25\mu\text{M}$ a $120\mu\text{M}$) por até 12h. As concentrações escolhidas para os demais experimentos foram $25\mu\text{M}$ (cerca de 10% de mortalidade) e $100\mu\text{M}$ (cerca de 30% de mortalidade) por 4h e 12h. As células foram coletadas em 4h, 12h e 24h após o início do tratamento. Após escolha do período de incubação e da concentração de interesse da droga, foram utilizados três grupos experimentais tratados com cada concentração de cisplatina (células sem infecção, células infectadas com *T. cruzi* Berenice, células infectadas com *T. cruzi* Colombiana) e três controles sem exposição à cisplatina (células sem infecção e infectadas com cada um dos parasitos). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

6 Tratamento com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Células L6 (5×10^4 células) foram semeadas em placas de 24 poços. O tratamento com H₂O₂ se deu 72h após a infecção com *T. cruzi*, expondo-se as células a meio DMEM acrescido de diferentes concentrações de H₂O₂ (de 0,8mM a 2,4 mM). As concentrações escolhidas para os demais experimentos foram 0,8mM (cerca de 10% de mortalidade) e 1,6mM (cerca de 30% de mortalidade) por 4h. As células foram coletadas em 4h, 12h e 24h após o início do tratamento. Foram utilizados três grupos experimentais tratados com cada concentração de H₂O₂ (células sem infecção, células infectadas com *T. cruzi* Berenice, células infectadas com *T. cruzi* Colombiana) e três controles sem exposição à H₂O₂ (células sem infecção e infectadas com cada um dos parasitos). Os parasitos também foram tratados com as maiores concentrações de cisplatina e H₂O₂ e sujeitos à avaliação do ciclo celular. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

7 Perfil de ciclo celular por citometria de fluxo

Dado o tratamento por exposição à cisplatina ou H₂O₂, as células foram coletadas após 4h, 12h, 24h, por tripsinização, juntamente com o meio de cultura para obtenção de possíveis células mortas no sobrenadante. Após lavagem com PBS, as células foram fixadas com etanol 70% por, no mínimo, 2h no gelo, lavadas mais uma vez com PBS e ressuspensas em solução de iodeto de propídeo (0,1% de Triton X-100, 10 µg/mL de PI e 100 µg/mL de RNase livre de DNase) diluído em PBS, por 10 min a 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em PBS e 20.000 eventos de cada amostra foram analisados no citômetro de fluxo, modelo Attune™ NxT (Thermo Fisher Scientific), no canal 574/26 (BL-2). O iodeto de propídeo (PI) é um intercalante de DNA e marca a célula de forma diretamente proporcional à quantidade de DNA que essa célula possui. Assim, em análise por citometria de fluxo, pode-se quantificar as populações que estão em G0/G1 (2N de DNA); em G2/M (4N de DNA); e as que estão na fase S (quantidades intermediárias de DNA). Aquelas células cujo DNA está fragmentado (correspondendo à morte celular) apresentam uma quantificação de fluorescência abaixo do pico G0/G1, sendo então chamadas de pico sub-G1. Foi considerada para a contagem eventos de tamanho muito pequeno (considerados apoptosomos ou corpos apoptóticos), e excluídos eventos de tamanho maior (considerados *doublets*) (Figura 8). O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinado manualmente por meio do software Attune™ NxT. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

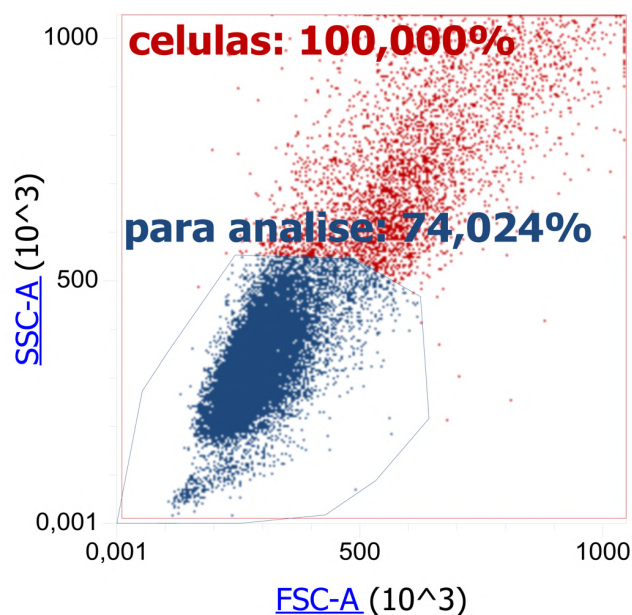


Figura 5. Dot Blot de células coletadas no citômetro de fluxo. Em azul, quadrante utilizado para selecionar células, evitando *doublets* e incluindo corpos apoptóticos.

8 Detecção de população com apoptose/necrose

Após tratamento com cisplatina ou H₂O₂ e recuperação de 24h, células foram coletadas, lavadas em PBS, e coradas com Anexina Alexa-fluor 488 e PI, segundo instruções do *Dead Cell Apoptosis Kit* (Invitrogen). As células coradas foram analisadas no citômetro Attune™ NxT (Thermo Fisher Scientific), nos filtros 530/30 (BL-1) e 574/26 (BL-2), após a devida compensação. Os quadrantes de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia e em necrose foram determinados considerando-se os controles do experimento (Figura 6), e as porcentagens calculadas por meio do software FlowJo™ 10. O controle da morte por apoptose se deu com tratamento com DMSO, e o controle de necrose com fervura por 5 minutos. Foi considerada para a contagem eventos de tamanho muito pequeno (considerados apoptosomos ou corpos apoptóticos), e excluídos eventos de tamanho maior (considerados *doublets*) (Figura 6). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

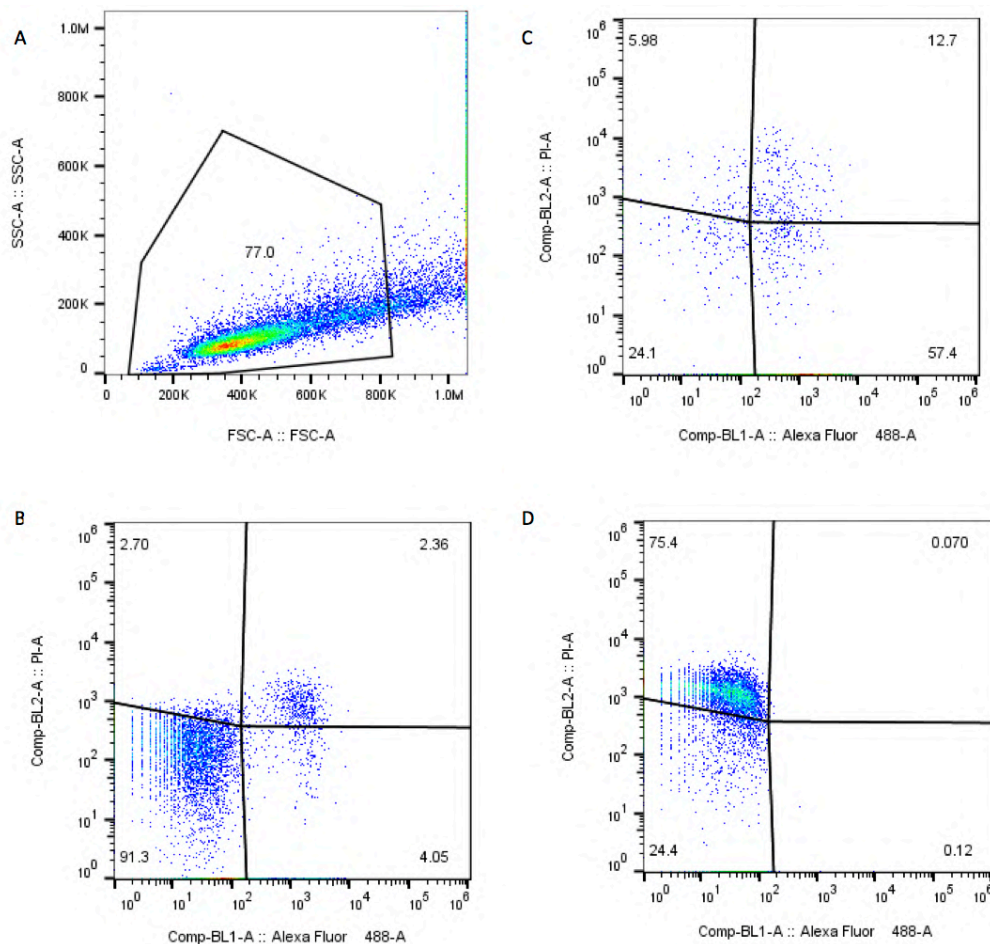


Figura 6. Padronização de experimento de citometria de fluxo para análise de apoptose/necrose por Anexina/PI. A) Quadrante utilizado para análise de células coletadas no citômetro de fluxo, incluindo eventos de tamanho pequeno considerados apoptosomos ou corpos apoptóticos. B) *Dot blot* de Anexina x PI de controle de célula viva. C) *Dot blot* de Anexina x PI de controle de célula morta por apoptose, tratada com DMSO. D) *Dot blot* de Anexina x PI de controle de célula morta por necrose, tratada com em fervura por 5 minutos.

9 Teste do Cometa

9.1 Alcalino

Após a coleta das células tratadas pelos diferentes períodos e concentrações de cisplatina e H_2O_2 , as amostras foram centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C e ressuspendidas em agarose *low-melting* 0,75% a 37°C. O gel com as células embutidas foi distribuído em uma lâmina de microscopia, previamente revestida de agarose 1%. As células, embutidas na agarose, foram submetidas à lise (NaCl 2,5M, EDTA 0,1M, Tris 10mM e Triton-X-100 14mM; pH10) por, no mínimo, uma hora, seguida de tratamento alcalino (NaOH 0,3M e EDTA 1mM; pH >30) por 40 minutos e eletroforese por 30 minutos, a 0,8V/cm. Após a eletroforese, as lâminas foram tratadas com uma solução de neutralização (Tris 0,4M; pH7,5), lavadas com água e

fixadas com etanol absoluto. A coloração para microscopia se deu com DAPI a 1µg/ml. As lâminas foram analisadas com microscópio Olympus BX51 e as fotos obtidas com o software cellSens, fornecido pelo fabricante. A análise dos cometas foi feita pelo software Tritex CometScore 2.0, observando-se o parâmetro porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

9.2 Neutro

Para efeito de comparação, o teste do cometa neutro foi realizado, apenas com as amostras tratadas com cisplatina 100µM e H₂O₂ 1,6mM, recuperadas por 24h. O protocolo é o mesmo do protocolo do cometa alcalino, com a exceção de que não houve a etapa de tratamento alcalino, e a eletroforese se deu em TBE 1X por 30 minutos. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

10 Avaliação de proliferação celular

Após tratamento com cisplatina 25µM ou 100µM por 12h, ou tratamento com H₂O₂ 0,8mM ou 1,6mM por 4h, as células foram coletadas, coradas com azul de tripan, e a viabilidade calculada por contagem no Cell Counter (Corning). Foram semeadas 5x10³ células viáveis em placas de 6 poços, mantidas em DMEM 5% SFB, 37°C e 5% de CO₂. No segundo dia após a semeadura, os poços foram gentilmente lavados com PBS para se eliminar parasitos no sobrenadante. As células cresceram por 7 dias e foram fixadas com metanol e coradas com solução cristal violeta 0,5%, segundo protocolo (CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE, 2016). A proliferação celular foi determinada pela formação de colônias contadas em microscópio invertido (Olympus CKX41). Foram consideradas colônias aquelas com mais de 50 células, mas também foram contados grupos entre 2 e 49 células e células sozinhas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

11 Morfologia celular

Fotos de 100 células coradas com cristal violeta e crescidas 7 dias após tratamento foram analisadas no software ImageJ quanto ao diâmetro de Feret. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

12 Extração de RNA e síntese de cDNA

As células expostas à cisplatina ou H₂O₂, por diferentes concentrações e períodos, foram conservadas a -80°C com solução de RNAlater® (Ambion) até a extração. A extração de RNA se deu utilizando-se o Purelink Mini *Kit* para Purificação de RNA (Invitrogen). O RNA extraído foi quantificado por meio do equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), e submetido à uma RT-PCR para síntese de cDNA, utilizando-se o kit *Hight Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems). Após a síntese, o cDNA foi quantificado no equipamento Nanovue (GE Healthcare), e diluído para 50ng/μL para ser usado na qPCR. Foi extraído o RNA e feita a síntese de cDNA de todas as triplicatas de cada grupo.

13 Avaliação da expressão de genes

Para avaliar a expressão de genes de reparo (*Atm*, *Brcal*, *Msh2*, *Ogg1*, *Pcna*, *Rad51*, *Rpal*, *Xpa*, *Xrcc1*, *Xrcc4*), de apoptose (*Bcl2*, *P53*) de proliferação celular (*Ki67*) e senescência (*P16* e *P21*), foi feita a qPCR utilizando o equipamento QuantStudio 5 (Thermo Scientific). Também foi avaliada a expressão da ORF 2 de LINE1. Foram avaliados tanto genes do hospedeiro quanto do parasito. Os genes de reparo de *T. cruzi* analisados foram *TcMSH2* e *TcPCNA*. A relação de genes e *primers* utilizados, como também as respectivas temperaturas de anelamento, estão apresentados na Tabela 1. Análise bioinformática utilizando o algoritmo Blastn mostrou não haver reconhecimento cruzado entre as sequências dos *primers* selecionados para o hospedeiro e o parasito, e a amplificação se mostrou específica para o hospedeiro (Figura 7) e para o parasito (Figura 8). Foi determinada curva padrão para cada par de *primer* utilizado (Figura 7), as quais apresentaram eficiências entre 90 e 110%, estando de acordo com as recomendações MIQE (TAYLOR *et al.*, 2019).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados na reação de qPCR, juntamente com a temperatura de anelamento utilizada no programa da reação.

Gene		Sequência do <i>primer</i>	T. de anelamento	Eficiência (%)	Espécie
GAPDH	<i>Forward</i>	5' ATGATTCTACCCACGGCAAG 3'	57°C	91,482	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CTGGAAGATGGTGATGGGTT 3'			
TBP	<i>Forward</i>	5' GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC 3'	50°C	106,167	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' TCTGGGTTTGATCATTTCTGTAG 3'			
ATM	<i>Forward</i>	5' GCGATGACCTGAGGCAAGAT 3'	50°C	94,335	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CTCAAGAACACCGCTTCGCT 3'			
BRCA1	<i>Forward</i>	5' GGCGAGAGCTAGAAGGAACC 3'	55°C	109,196	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' AGCAAACCTTTTGCACGGTCA 3'			
MSH2	<i>Forward</i>	5' CATCCAGGCATGCTGTGTTGA 3'	55°C	96,826	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GCAGTCCACAATGGACACTTC 3'			
OGG1	<i>Forward</i>	5' CAACATTGCTCGCATCACTGG 3'	58°C	101,183	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GGCTTTAGCACTGGCACATACA 3'			
PCNA	<i>Forward</i>	5' GAGCAACTTGGAATCCCAGAAGAGG 3'	57°C	91,548	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CCAAGCTCCCCACTCGCAGAAAAC 3'			
RAD51	<i>Forward</i>	5' GCATAAATGCCAACGATGTG 3'	55°C	101,367	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GTGGTGAAACCCATTGGAAC 3'			
RPA1	<i>Forward</i>	5' TGCTGAGGAAGTTAAGCCAGAA 3'	50°C	97,2	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' TAGGCCTCTGGGATGTCAGG 3'			
XPA	<i>Forward</i>	5' GGGGTGATATGAAACTCTACTTAAAG 3'	50°C	96,689	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CCTGTCGGACTTCCTTTGC 3'			
XRCC1	<i>Forward</i>	5' GCCTTTGTGGAGGTGCTAGT 3'	60°C	94,562	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CTGAGATGTAGCCTCTGCCTC 3'			
XRCC4	<i>Forward</i>	5' CTGAGGAGGATGGGCTTATGAT 3'	58°C	98,411	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CAAGATTTGCTGCATTCCGGTGT 3'			
LINE 1 ORF2	<i>Forward</i>	5' TGTGGGGCATTTTTGGGTAT 3'	58°C	90,351	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GGAATGTGCAATGGCTGAGAAA 3'			
BCL2	<i>Forward</i>	5' CCTGTGGATGACTGAGTACC 3'	50°C	95,733	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GAGACAGCCAGGAGAAATCA 3'			
P53	<i>Forward</i>	5' ACTTACCAAGGCAACTATGGC 3'	53°C	90,389	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GGCAGAACAGCTTATTGAGGG 3'			
P16	<i>Forward</i>	5' TCCGAGAGGAAGGCGAACTC 3'	55°C	106,096	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' GCTGCCCTGGCTAGTCTATCTG 3'			
P21	<i>Forward</i>	5' TGTTCCACACAGGAGCAAAG 3'	57°C	90,331	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' AACACGCTCCAGACGTAGT 3'			
Ki67	<i>Forward</i>	5' AACCAGGACTTTGTGCTCTGTAA 3'	60°C	109,778	<i>Rattus norvegicus</i>
	<i>Reverse</i>	5' CTCTTTGGCTTCCATTTCTTC 3'			
Tc40S	<i>Forward</i>	5' TGCGAAGACGAGGAGTACAA 3'	58°C	95,917	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	<i>Reverse</i>	5' GCCACACACGAGCACTAAA 3'			
TcMSH2	<i>Forward</i>	5' GATGAACGGGACGTGTCTGT 3'	50°C	101,436	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	<i>Reverse</i>	5' AGGCATCAAGACTGGTCAGC 3'			
TcPCNA	<i>Forward</i>	5' ACCAAGTACCAGTGTGAGCG 3'	53°C	91,767	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	<i>Reverse</i>	5' TCACACTTGCGGGACTTCTC 3'			

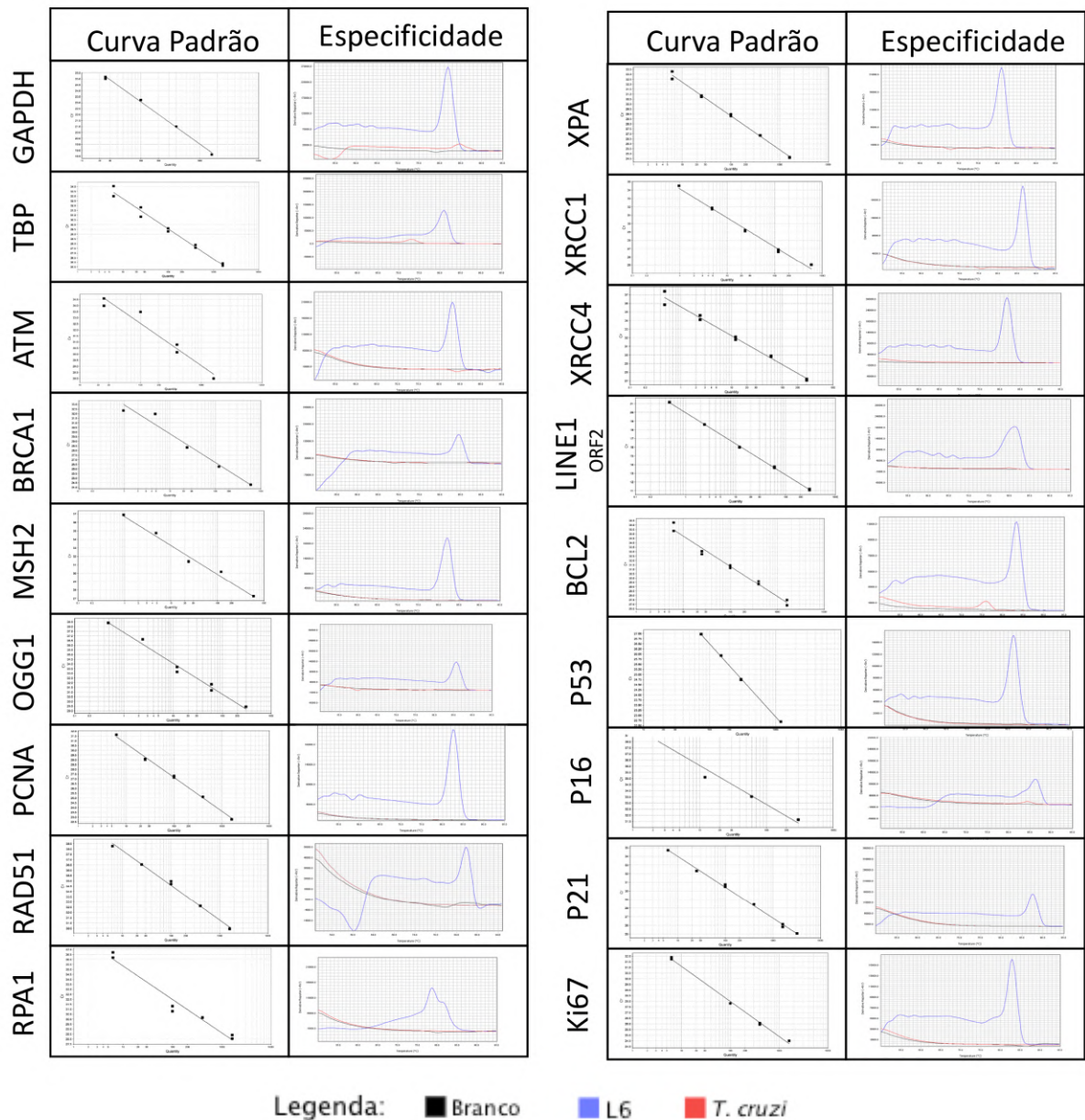


Figura 7. Curva padrão e curva de *melting* dos *primers* do hospedeiro utilizados no trabalho. GAPDH e TBP são os genes de referência. *Atm*, *Brcal*, *Ogg1*, *Msh2*, *Pcna*, *Rad51*, *Rpa1*, *Xpa*, *Xrcc1* e *Xrcc4* referem-se a genes de reparo. *Bcl2* e *P53* tem função anti- e pró-apoptótica, *Ki67* está relacionado a proliferação celular e *P16* e *P21* envolvidos na senescência. Veja que os *primers* específicos para L6 (azul) não reconhecem sequência do parasito (vermelho).

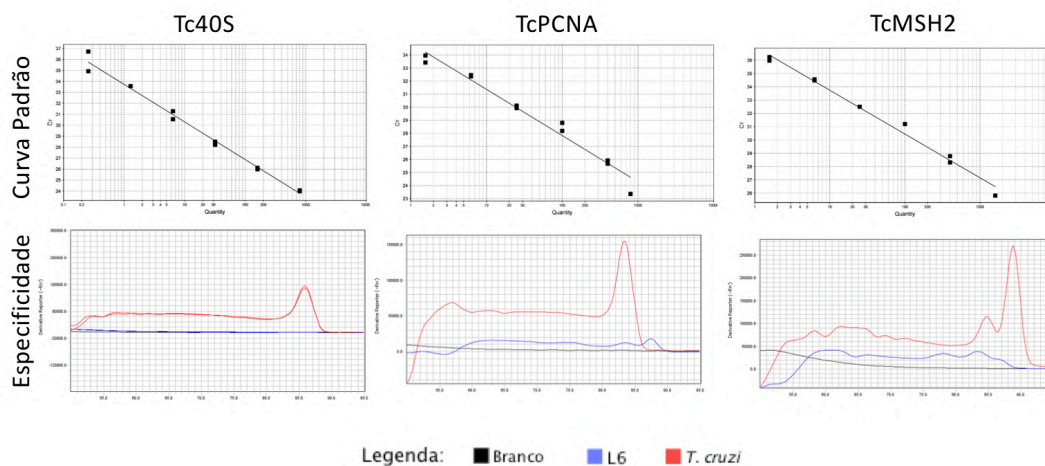


Figura 8. Curva padrão e curva de *melting* dos *primers* de *Trypanosoma cruzi* utilizados no trabalho. *Tc40S* é o gene de referência. *TcPCNA* e *TcMSH2* são genes de reparo do parasito. Veja que os *primers* específicos para o parasito (vermelho) não reconhecem sequência de L6 (azul).

Para cada reação, utilizou-se 10 μ L do SYBR Mix (Invitrogen), 8nM de primer e 100 ng de cDNA, exceto para as reações específicas para *P16*, onde utilizou-se 12nM de primer. O programa de reação consistiu em:

- 50°C – 2 minutos
 - 95°C – 10 minutos
 - 95°C – 15 segundos
 - T. de anelamento (Ver tabela 1) – 30 segundos
 - 72°C – 10 segundos
 - 95°C – 5 segundos
 - 50°C – 15 segundos
 - 95°C – 5 segundos
- } 40x

A reação de qPCR de cada amostra foi feita em duplicata. O cálculo para normalização e quantificação relativa foi feito segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os genes de referência utilizados para o hospedeiro foram *Gapdh* e *Tbp*; e o gene de referência para o parasito foi *Tc40S*. Os resultados da expressão dos genes foram representados em gráficos no formato $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e em *heatmaps* construídos pelo software online DisplayR (disponível em app.displayr.com), com dados apresentados em escala logarítmica.

14 Quantificação de *Trypanosoma cruzi* a partir de Tc40S

Foi detectada também a quantidade de parasitos presentes nas amostras de células L6. A quantificação absoluta utilizou como referência os valores calculados a partir da quantidade de DNA na curva padrão (Eficiência = 95,917% e $R^2 = 0,988$). Também foi calculada a quantidade relativa de parasitos dividindo o valor da quantificação absoluta de *T. cruzi* pelo valor da quantificação absoluta de células L6. Esta foi calculada a partir da curva padrão do gene TBP (Eficiência= 106,167% e $R^2=0,983$).

15 Testes estatísticos

Os testes estatísticos foram realizados no software SPSS. Para comparação de médias, foram realizadas *one-way* ANOVA, com os testes posteriori específicos de acordo com a característica da amostra analisada: teste Tukey para amostras com homogeneidade de variância e mesmo número amostral entre grupos; teste Sidak para amostras com homogeneidade de variâncias mas número amostral diferente entre grupos; e teste Games-Howell para amostras sem homogeneidade de variâncias, para verificação de diferença entre grupos. Também foram feitas análises de Modelo Linear Geral univariado e regressão linear, nas análises de tendências, e testes de correlação bivariada entre os genes analisados, utilizando-se coeficiente de correlação de Pearson.

V. Resultados

1 Determinação da parasitemia

Para confirmação da parasitemia, as culturas de células L6, previamente semeadas em placas de 24 poços, foram infectadas com uma quantidade de 5x de formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Berenice e Colombiana, e a infecção manteve-se por 72h. A contagem manual a fresco de 100 células infectadas (Figura 9) e não infectadas em microscópio invertido mostrou que a taxa de infecção por *T. cruzi* Berenice foi de 50,5% e de *T. cruzi* Colombiana foi de 57% das células L6. Resultado semelhante foi encontrado ao contar células coradas com Giemsa (Berenice 50% e Colombiana 51,8%). Um tempo menor de infecção não possibilitou a infecção de 50% das células, e uma quantidade maior de parasito levou à mortalidade das células, com várias células rompidas. A média da quantidade de amastigotas por célula L6 foi de 19,03 para a cepa Berenice e de 16,96 para a cepa Colombiana.

Assim, por conseguir infectar pelo menos 50% das células sem grande mortalidade, a quantidade de 5x de parasito e o tempo de 72h de infecção foi escolhido como o ideal para os demais experimentos, cujo resumo de resultados poderá ser visualizado nos Anexos I e II. Interessantemente, a análise por citometria de células infectadas com parasitos previamente corados com corante fluorescente PKH26 mostrou um percentual maior de infecção: Berenice infectou 65% das células e Colombiana infectou cerca de 70% (Figura 10).

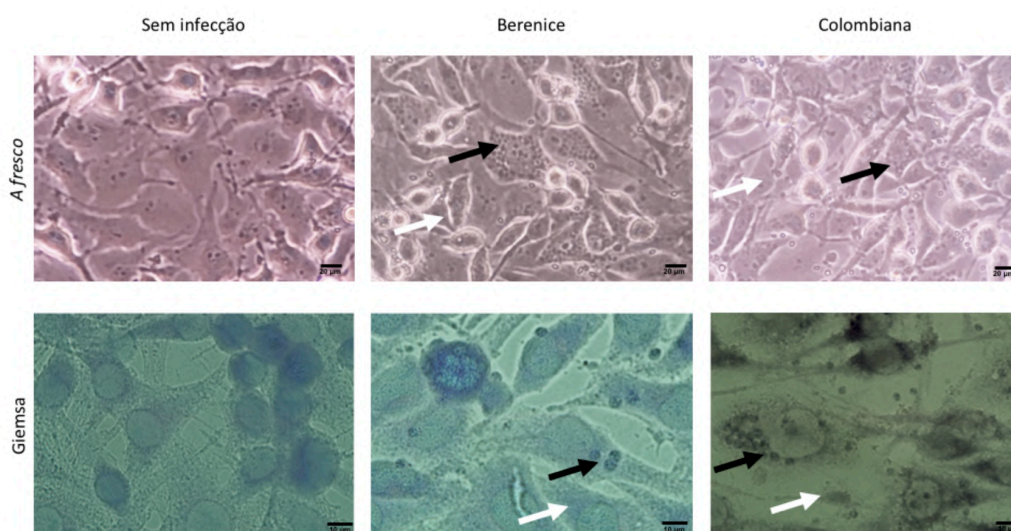


Figura 9. Cultura de células L6 infectadas com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* e visualizadas a fresco ou após coloração com Giemsa. Observa-se células repletas de ninhos de amastigota em seu citoplasma (setas pretas) e células não infectadas (setas brancas). A contagem de células infectadas e não infectadas apontou que Berenice infecta 50,5% das células e Colombiana infecta 57%.

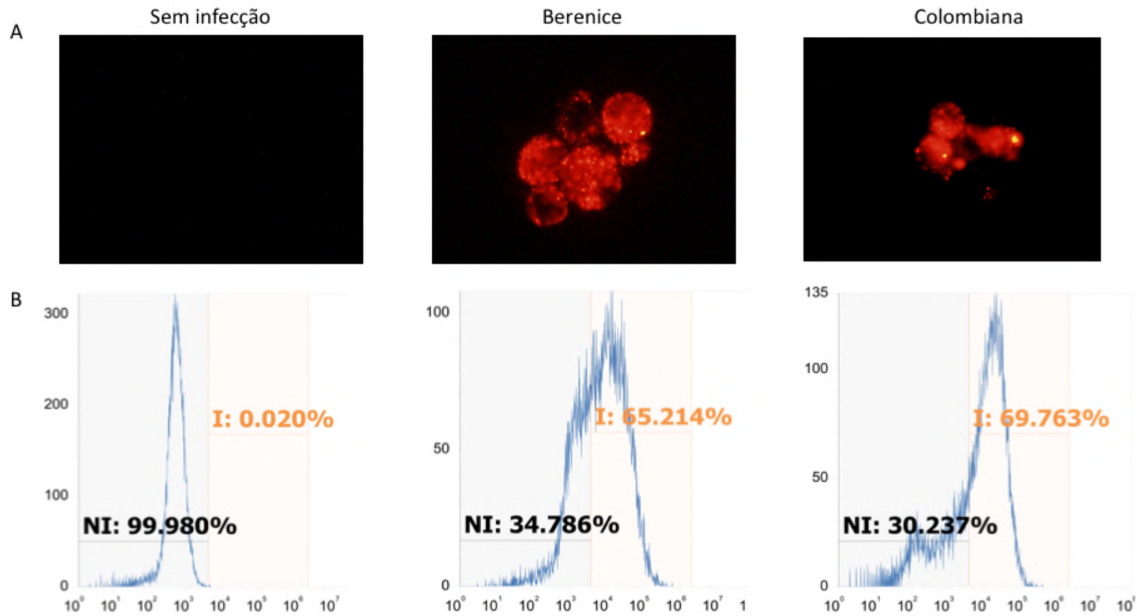


Figura 10. Determinação da parasitemia por meio da coloração com PKH26. (A) Os ninhos de amastigota aparecem com coloração vermelha dentro de células infectadas visualizadas por microscopia de fluorescência. (B) Análise por citometria mostra que Berenice infecta cerca de 65% das células e Colombiana, 70%.

2 Efeito da infecção de *Trypanosoma cruzi* em células L6

2.1 Efeito da infecção na mortalidade

A avaliação da porcentagem de células em sub-G1 (que indica mortalidade), revelou que a infecção por *T. cruzi* levou a um aumento significativo da mortalidade ($p < 0,05$), tanto por Berenice como por Colombiana, correspondendo a uma taxa média de 7,16 e 9,03%, respectivamente (Figura 11A). Não houve diferença estatística entre as cepas na mortalidade das células infectadas ($p = 0,51$). No entanto, ao se avaliar a mortalidade por anexina/PI, não houve diferença estatística na mortalidade entre os grupos e nem com relação à apoptose, apoptose tardia e necrose (Figura 11B).

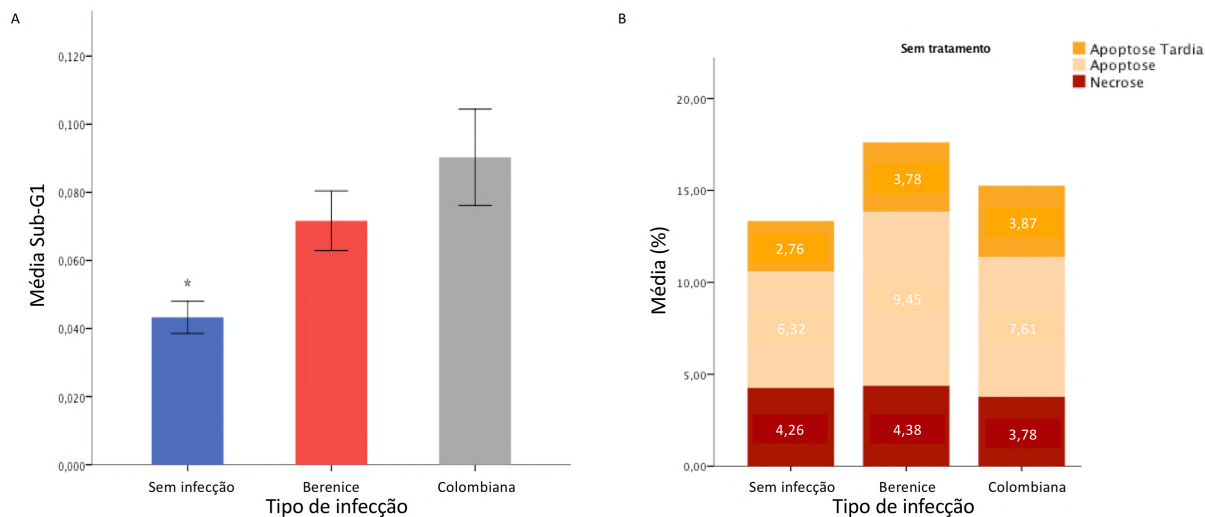


Figura 11. Mortalidade em células sem infecção e infectadas por *Trypanosoma cruzi*. A) Proporção de células L6 mortas (sub-G1) em culturas não infectadas, infectadas com *T. cruzi* Berenice e infectadas com *T. cruzi* Colombiana. B) Tipificação da morte celular por teste Anexina/PI, indicando mortalidade por necrose, apoptose e apoptose tardia, com as devidas porcentagens. * $p < 0,05$

2.2 Efeito da infecção na degradação de DNA e reparo

O teste do cometa, que avalia a degradação de DNA, não apresentou diferença estatística entre células infectadas e não infectadas. De fato, todas as amostras apresentaram mediana = 0% de DNA na cauda do cometa, ou seja, sem degradação de DNA. A infecção também não mostrou alteração da degradação de DNA no teste do cometa neutro, que indica DSBs.

2.3 Efeito da infecção na proliferação celular

No ensaio da proliferação, observando-se o número de colônias (mais de 50 células) coradas por cristal violeta, as células infectadas com *T. cruzi* Colombiana tiveram uma proliferação significativamente menor ($p < 0,05$) que as células infectadas com Berenice e sem infecção (Figura 12). Não houve diferença na quantidade de colônias entre as células infectadas com Berenice e sem infecção ($p = 0,262$). Foi contabilizado também o número de grupos de 2 a 49 células e o número de células sozinhas (Figura 12C) e, para ambos os testes, não houve diferença significativa entre os tipos de infecção ($p = 0,179$ e $p = 0,101$, respectivamente). Quanto ao ciclo celular (Figura 12D), não houve diferença estatística entre os grupos não infectados e infectados com *T. cruzi* ($p = 0,667$). Também não se verificou diferença estatística no diâmetro de Feret das células analisadas ($p = 0,581$; dado não mostrado).

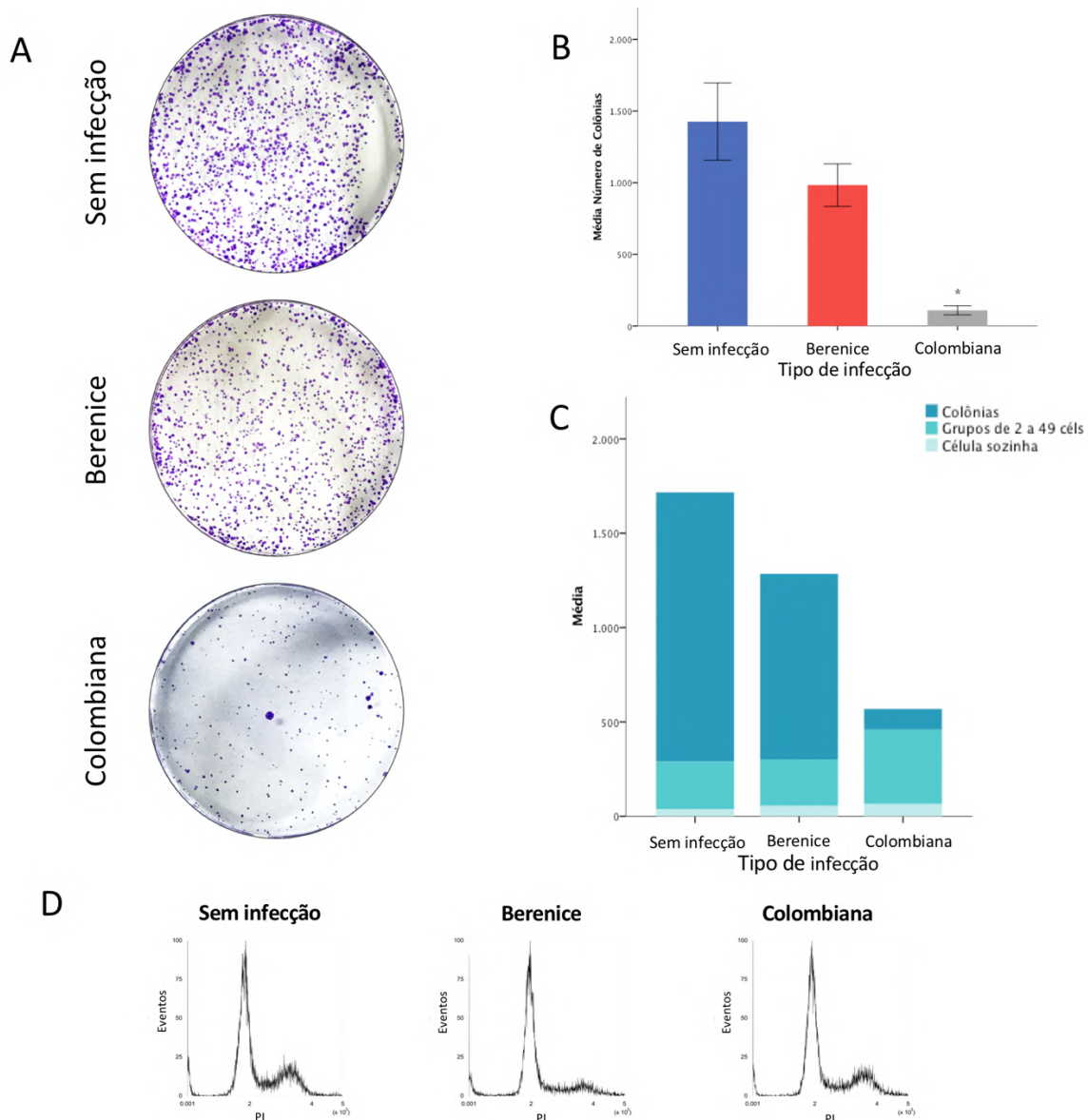


Figura 12. Proliferação de células L6 infectadas ou não com o *Trypanosoma cruzi*. A) Foto dos poços corados com cristal violeta mostrando colônias em células sem infecção, infectadas com *T. cruzi* Berenice e infectadas com *T. cruzi* Colombiana. B) Média do número de colônias (mais de 50 células) da triplicata. C) Média do número de colônias, grupos de 2 a 49 células e células sozinhas na triplicata. D) Perfil do ciclo celular de células não infectadas, infectadas com *T. cruzi* Berenice e infectadas com *T. cruzi* Colombiana. * $p < 0,05$

2.4 Efeito da infecção na expressão de genes

Não houve diferença significativa na expressão de nenhum gene analisado entre células infectadas e não infectadas. As células apresentaram expressão semelhante de genes relacionados à mortalidade celular (*Bcl2* e *P53*), reparo de DNA (*Atm*, *Brcal*, *Ogg1*, *Msh2*, *Pcna*, *Rad51*, *Rpa1*, *Xpa*, *Xrcc1*, *Xrcc4*), proliferação e senescência (*Ki67*, *P21* e *P16*) e na expressão da ORF2 de LINE1.

3 Influência da infecção após tratamento com cisplatina

3.1 Efeito da cisplatina na mortalidade de células L6

Inicialmente, diferentes concentrações de cisplatina foram utilizadas a fim de se obter uma curva de mortalidade (sub-G1) de células L6. O tratamento ocorreu por 12h e as células tratadas foram avaliadas em dois momentos: imediatamente após o término do tratamento e após um período de 12h de recuperação (que corresponde a 24h desde o início do tratamento). Observou-se que não houve influência da concentração na mortalidade quando as células eram avaliadas imediatamente após o tratamento (Figura 13A). No tempo de 12h de tratamento mais 12h de recuperação, ou seja, 24h após o início do tratamento, no entanto, a influência da concentração foi significativa ($p < 0,001$). Desta forma, o tempo de recuperação, junto com o aumento da concentração de cisplatina, parece representar uma interferência importante para a mortalidade de células tratadas ($p < 0,05$). O tempo de recuperação também se mostrou significativo no teste do cometa ($p < 0,001$), que mede degradação de DNA, sendo estatisticamente relevante apenas as amostras avaliadas 24h (12h de exposição +12h de recuperação) após o início do tratamento (Figura 13B).

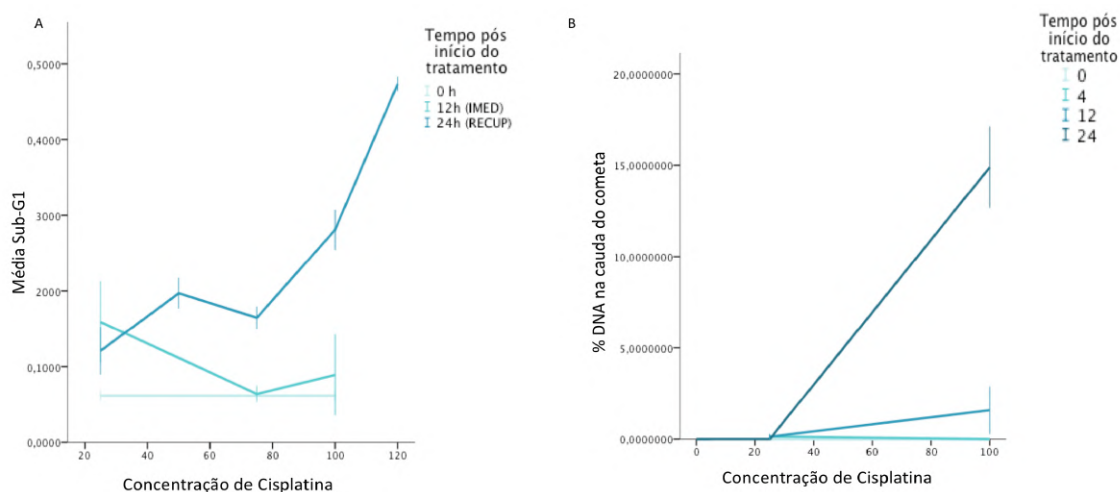


Figura 13. Efeito da concentração de cisplatina na taxa de mortalidade e degradação de DNA de células L6. A) Efeito da concentração de cisplatina na mortalidade (sub-G1) de células avaliadas imediatamente (azul claro – 12h) e após o período de recuperação (azul escuro - 24h). B) Efeito da concentração da cisplatina na degradação de DNA de células avaliadas após 4h (azul claro), 12h (imediatamente) e 24h (azul escuro) do início do tratamento.

O aumento na concentração de cisplatina levou ao aumento na expressão de *P21* ($p < 0,05$), *Pcna* ($p < 0,05$) e *Rad51* ($p < 0,01$), desde as 4h primeiras horas de tratamento, indicando que desde o início vias de reparo estavam sendo ativadas, em especial em relação ao controle de proliferação celular e recombinação homóloga. Após 12h do início do tratamento,

observa-se um aumento na expressão de *Msh2* ($p < 0,001$) e redução na expressão de *Atm* ($p < 0,01$), o que representa ativação da via MMR, e uma inativação do reparo via HR com uma alta concentração de cisplatina. Já após o período de recuperação (ou seja, 24h após o início do tratamento), observa-se uma redução significativa na expressão de *Bcl2* ($p < 0,05$) e aumento na expressão de *P53* ($p < 0,01$), sugerindo uma ativação da via apoptótica. Os *heatmaps* da expressão de genes estão apresentados nas Figuras Figura 24, Figura 25, 28 e Figura 29.

3.2 Efeito da infecção de *T. cruzi* em células L6 expostas à cisplatina

3.2.1 Efeito na mortalidade

Como foi verificado, após o período de recuperação, ou seja, 24h após o início do tratamento, o aumento na concentração de cisplatina tem uma relação positiva com a taxa de mortalidade (Sub-G1) de células L6. O mesmo aconteceu com células infectadas (Figura 14A), sendo que, naquelas infectadas por *T. cruzi* Berenice, a mortalidade foi significativamente maior ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na mortalidade entre células não infectadas e infectadas com a cepa Colombiana. A regressão mostrou que a relação entre concentração e taxa de mortalidade é linear, sendo: para sem infecção, $R^2 = 0,821$; para Berenice, $R^2 = 0,826$; e para Colombiana, $R^2 = 0,892$. Como esperado, quando avaliadas imediatamente após o tratamento, ou seja, 12h após o início do tratamento, não houve relação linear entre o aumento da concentração e a mortalidade, para nenhum dos grupos (Figura 14B).

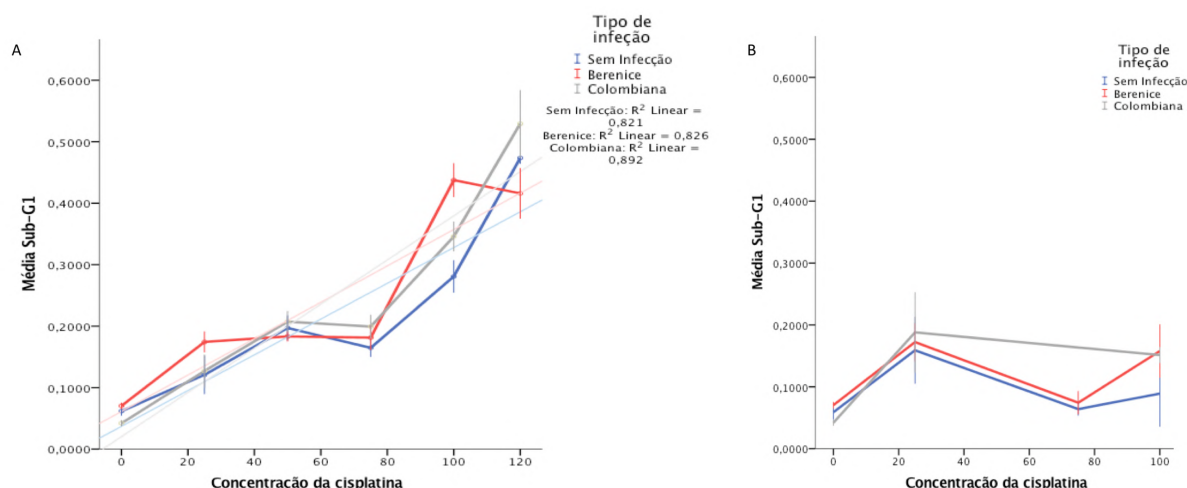


Figura 14. Relação da concentração de cisplatina (μM) com a taxa de mortalidade (sub-G1) de células L6 infectadas ou não com *o Trypanosoma cruzi*. A) A mortalidade foi avaliada 24h após o início do tratamento (12h de exposição + 12h de recuperação). As linhas em cores mais claras representam o modelo linear proposto para cada grupo. Note que a mortalidade de células L6 infectadas com a cepa Berenice se mostrou significativamente maior que nos demais grupos ($p < 0,05$). B) Taxa de mortalidade avaliada imediatamente após o término do tratamento. Não se verificou relação linear em nenhum grupo.

Com base nos resultados obtidos e apresentados nas Figuras Figura 13 e Figura 14, foram escolhidas duas concentrações de cisplatina para as demais análises: 25 μ M e 100 μ M. Tais concentrações correspondem, respectivamente, a taxas de mortalidade baixa (12%) e moderada (28%) em células não infectadas, possibilitando verificar a influência da infecção por *T. cruzi* em uma porcentagem significativa de células viáveis, mas que apresentam algum grau de dano a seu DNA.

Detalhando os experimentos de mortalidade (Sub-G1) em células tratadas com cisplatina 25 μ M, percebe-se que, apesar de o tempo pós início do tratamento estabelecer uma relação positiva com a mortalidade ($p < 0,05$), especialmente entre 0 e 12h ($p < 0,01$) e 0 e 24h ($p < 0,001$), não há diferença significativa entre células não infectadas e infectadas com *T. cruzi* ($p = 0,978$) (Figura 15A).

Com o tratamento mais intenso, a 100 μ M, evidencia-se a influência da infecção do *T. cruzi* na mortalidade (sub-G1) ao longo do tempo ($p < 0,05$). Essa relação entre tempo e mortalidade se torna significativa, no entanto, apenas após o período de recuperação (24h), onde células infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentam mortalidade significativamente maior que células sem infecção ($p < 0,01$) (Figura 15B, C, D e E).

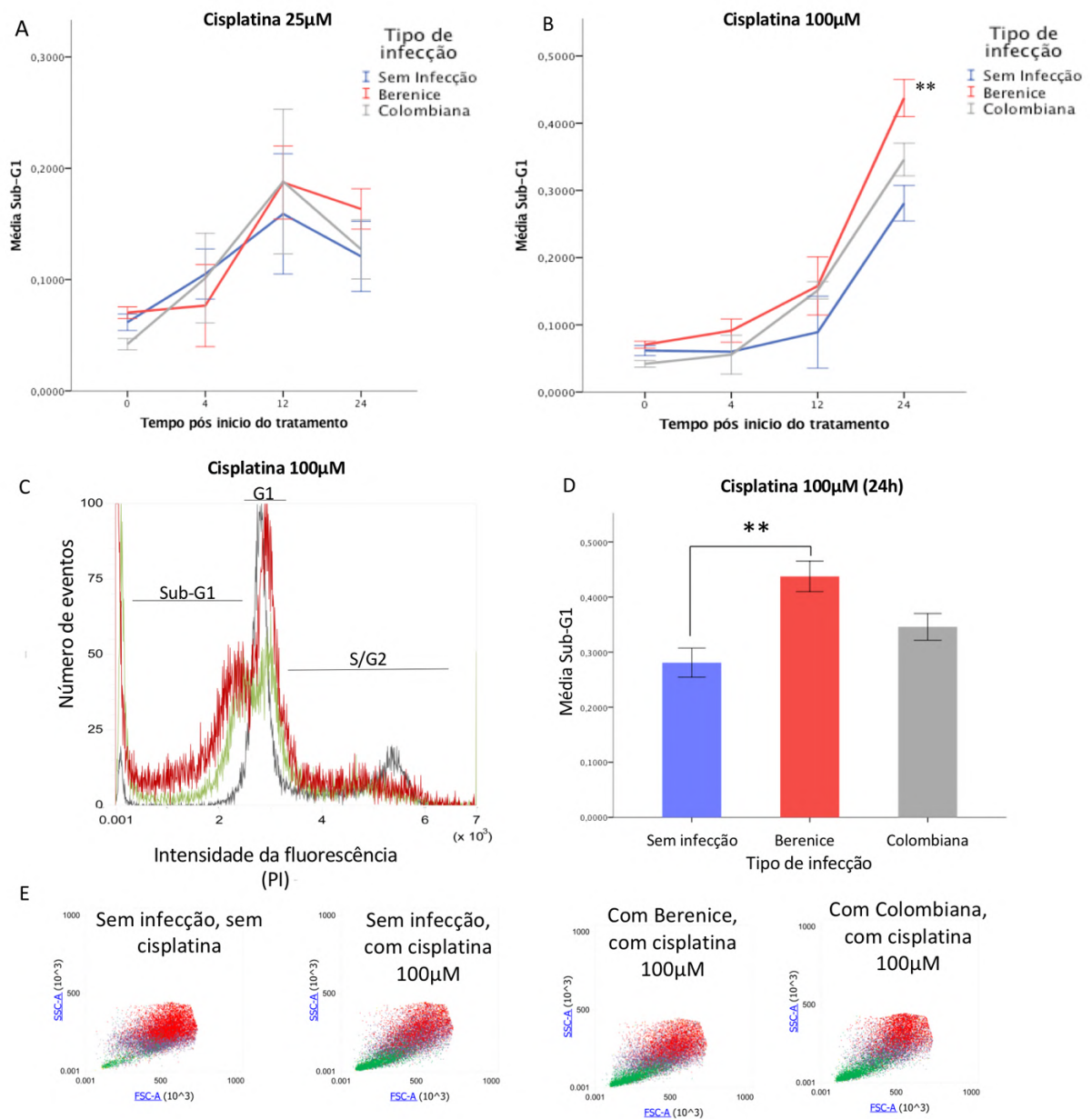


Figura 15. Efeito da cisplatina a 25µM ou 100µM na mortalidade (sub-G1) de células L6 infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*. A) Proporção de mortalidade (células em sub-G1) após tratamento com cisplatina 25µM, de acordo com o tempo pós início do tratamento (em horas). B) Proporção de células em sub-G1 em relação ao tempo após o início de tratamento com cisplatina 100µM (em horas). C) Histograma do ensaio de células tratadas com cisplatina 100µM coradas com iodeto de propídeo, mostrando o ciclo celular de cada população. Em verde, células L6 não infectadas tratadas com cisplatina. Em vermelho, células L6 infectadas com *T. cruzi* da cepa Berenice tratadas com cisplatina. Em cinza, células controle, não tratadas. Nota-se que a fase sub-G1 é maior nas células infectadas que nas células não infectadas. D) Porcentagem de células mortas (sub-G1) não infectadas e infectadas com diferentes cepas de *T. cruzi*, 24h após tratamento com cisplatina 100µM. E) *Dot blot* da citometria apresentando a população de células L6 avaliadas. Em verde, a população de células consideradas mortas (sub-G1). Em avermelhado, células vivas. **p<0,01

3.2.2 Classificação da Morte Celular

Após a determinação da taxa de mortalidade de células L6, infectadas ou não com *T. cruzi*, e expostas à cisplatina, foi realizado o teste de anexina/PI para verificar se a morte das células estava ocorrendo por necrose, apoptose ou apoptose tardia. Na Figura 16A, podemos observar que o aumento na concentração da droga levou ao aumento de necrose, apoptose e apoptose tardia ($p < 0,001$), sem diferença significativa entre os tipos de infecção.

A maior concentração da droga ($100\mu\text{M}$) promoveu os três tipos de morte celular de maneira indistinta entre os grupos, ainda que a maior mortalidade tenha se dado por apoptose (média de 19,24% para apoptose e 6,7% para apoptose tardia). A menor concentração de cisplatina ($25\mu\text{M}$) promoveu principalmente uma morte celular do tipo apoptose tardia, sem diferença significativa entre os grupos (Figura 16B). Interessantemente, nessa concentração, verificamos que há diferença significativa entre todos os grupos ($p < 0,01$) quanto à mortalidade por necrose, sendo que em células não infectadas é menor (3,18%), e em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana a necrose é maior (4,51%) (Figura 16C).

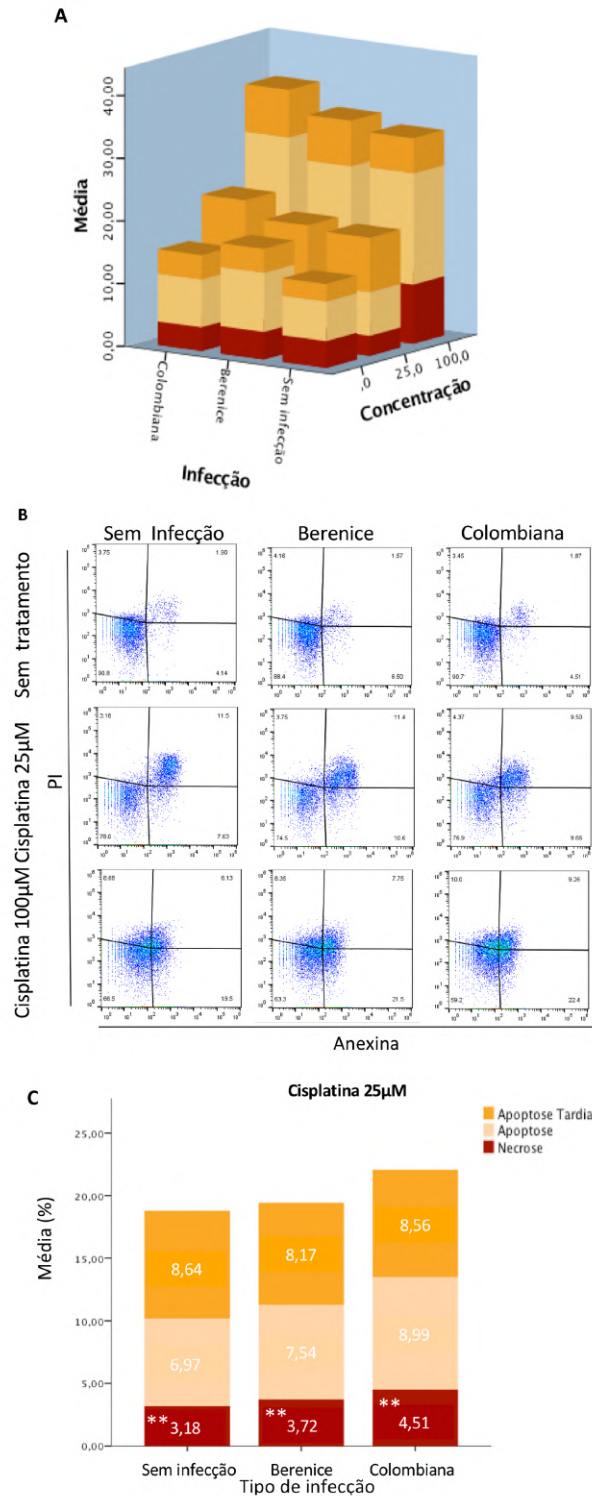


Figura 16. Tipo de morte celular de células L6, infectadas ou não com o *Trypanosoma cruzi*, expostas à cisplatina. A) Gráfico tridimensional apresentando os tipos de morte celular (apoptose, apoptose tardia e necrose) em relação ao aumento da concentração de cisplatina e tipo de cepa infectante. Note que há uma tendência de aumento da mortalidade com o aumento da concentração. B) *Dotblot* da citometria mostrando células vivas (Anexina- e PI-), em necrose (Anexina- e PI+), entrando em apoptose (Anexina+ e PI-) e em apoptose tardia (Anexina+ e PI+). C) Porcentagem de células em necrose, apoptose e apoptose tardia após 24h do tratamento com cisplatina 25µM. **p<0,01

3.2.3 Efeito na degradação de DNA

Quanto à degradação de DNA, o teste do cometa revelou uma relação linear entre a concentração da cisplatina e a degradação de DNA ($p < 0,001$) após o período de recuperação (tempo 24h) (Figura 17). Essa relação foi significativamente maior em células infectadas por *T. cruzi* Berenice ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre células sem infecção e células infectadas por *T. cruzi* Colombiana ($p = 0,969$), corroborando com os resultados encontrados em sub-G1.

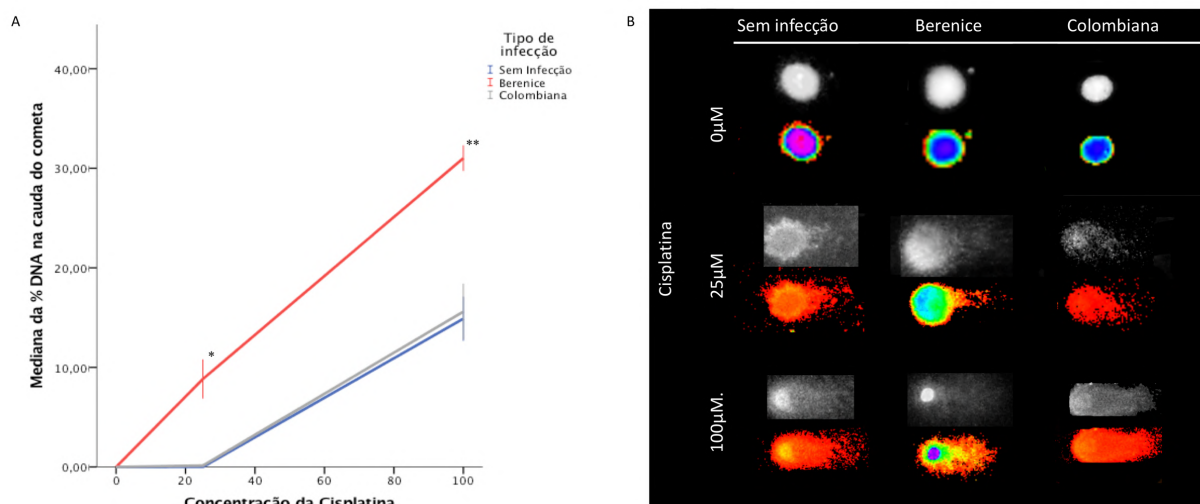


Figura 17. Influência da concentração de cisplatina na degradação de DNA de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*. A) Gráfico mostrando a mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa em relação à concentração de cisplatina. A degradação de DNA é significativamente maior em células infectadas por *T. cruzi* Berenice ($p < 0,001$). B) Cometa representativo do valor da mediana em diferentes concentrações de cisplatina (0µM, 25µM e 100µM), apresentado pela foto em escala de cinza e por cores de acordo com a intensidade. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

Assim, vimos que em células não infectadas, praticamente não houve degradação de DNA com o tratamento com cisplatina 25µM (mediana de % de DNA da cauda = 0), em nenhum tempo analisado. Já em células infectadas com *T. cruzi*, essa degradação foi visível em algumas amostras da triplicata, sendo significativa apenas para células infectadas com a cepa Berenice (Figura 18A), e avaliadas 24h após o início do tratamento ($p < 0,05$). Nos demais tempos, não houve diferença significativa entre os grupos.

No tratamento com cisplatina a 100µM, a degradação de DNA aumenta ao passar do tempo pós início do tratamento (Figura 18B), de maneira semelhante ao encontrado em sub-G1, também sendo significativa apenas após o período de recuperação, ou seja, no tempo de 24h ($p < 0,001$). O tipo de infecção também afetou a degradação de DNA ($p < 0,001$). Células

infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentam, 24h após o início do tratamento (12h tratamento + 12h recuperação), significativamente mais degradação de DNA que células infectadas com Colombiana ou não infectadas ($p < 0,01$) (Figura 18D). Não existe diferença estatística entre a degradação de DNA de células infectadas com *T. cruzi* Colombiana e células não infectadas ($p = 0,658$). Imediatamente após o fim do tratamento (12h) com cisplatina $100\mu\text{M}$, foi detectada degradação de DNA nos três grupos, mas sem diferença significativa entre eles (Figura 18C). Às 4h, apenas células infectadas com a cepa Colombiana apresentaram algum grau de degradação de DNA (mediana acima de zero), mas não foi significativo.

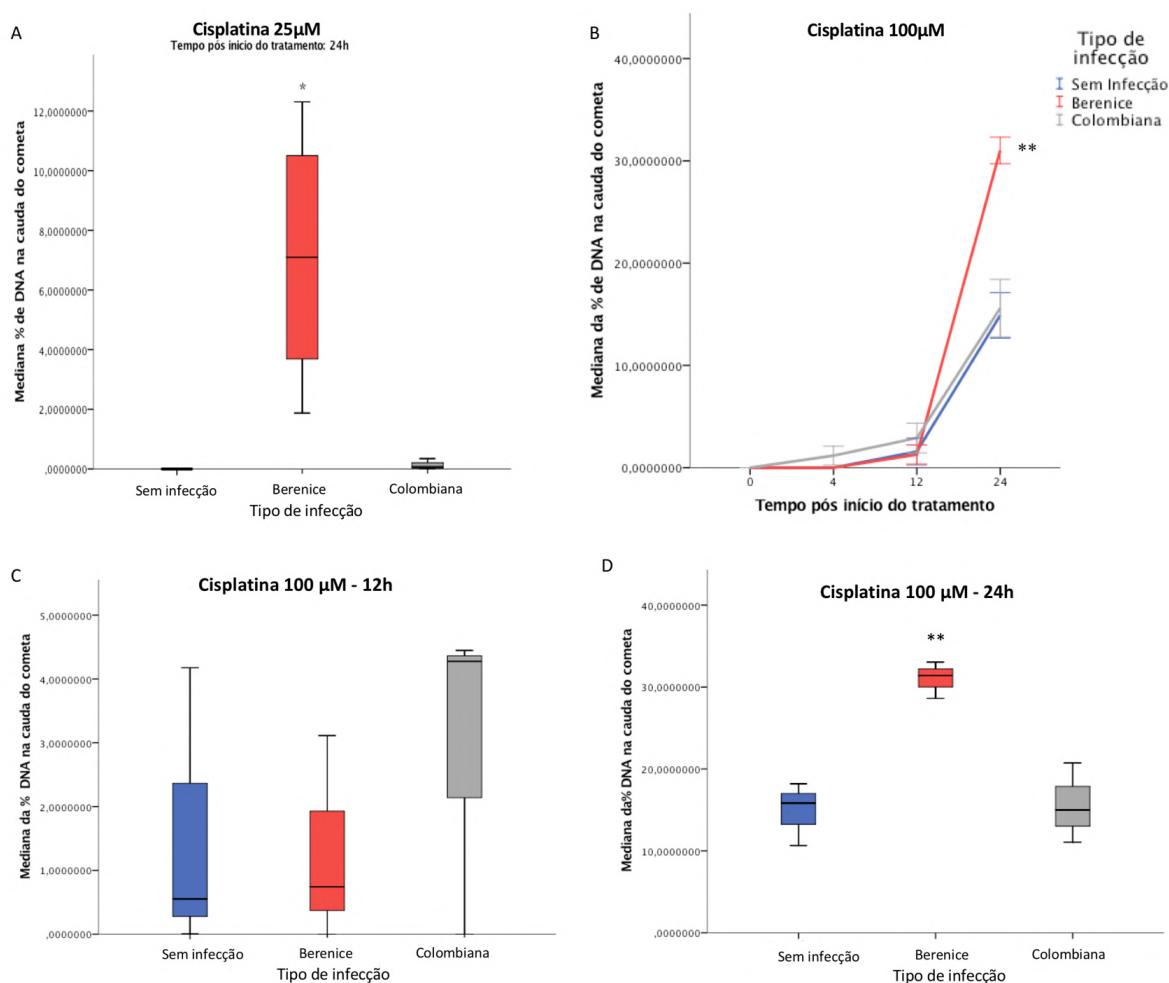


Figura 18. Degradação de DNA e Reparo em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Cisplatina a 25 ou $100\mu\text{M}$. A) Degradação de DNA segundo o teste do cometa, 24h após o início do tratamento com cisplatina $25\mu\text{M}$. B) Mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa de células tratadas com cisplatina $100\mu\text{M}$, de acordo com o tempo após o início do tratamento (h). C) *Box plot* da mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa imediatamente após o tratamento com cisplatina $100\mu\text{M}$ (12h). D) *Box plot* da mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa após período de recuperação do tratamento com cisplatina $100\mu\text{M}$ (24h). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

O teste do cometa neutro em células tratadas com cisplatina 100 μ M, avaliadas após o período de recuperação (24h), indicou que, em células não infectadas e em células infectadas com Colombiana, foi baixa a taxa de quebra de dupla fita ao se comparar com os dados do cometa alcalino (Figura 19). A mediana do cometa neutro foi significativamente maior em células infectadas por Berenice ($p < 0,05$). Mesmo assim, a maior parte da degradação de DNA neste grupo se deu por quebra de simples fita, inferindo-se por comparação com o resultado do cometa alcalino.

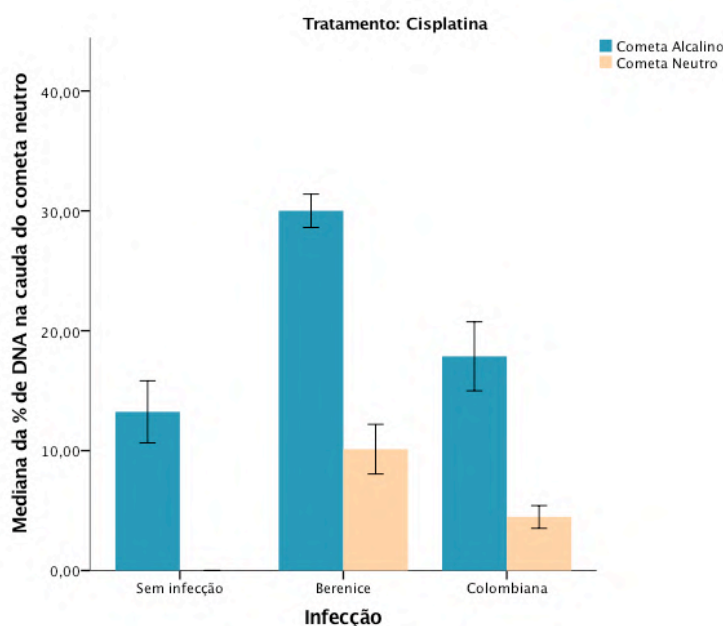


Figura 19. Teste do cometa alcalino e neutro em células tratadas com cisplatina 100 μ M. Mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa de células tratadas com cisplatina 100 μ M, de acordo com o tempo após o início do tratamento (h).

3.2.4 Efeito na proliferação celular

Em relação ao efeito da cisplatina sobre a proliferação de células L6, verificamos que, mesmo sete dias após o fim do tratamento, não houve formação de colônia (>50 células) em nenhum grupo tratado (Figura 20A). Somente o grupo infectado com a cepa Berenice apresentou grupamento de 2 a 49 células na triplicata, no tratamento a 25 μ M, sendo portanto, significativamente relevante ($p < 0,05$) em relação às células infectadas com Colombiana (Figura 20B e C), que não apresentou nenhum grupamento de células. O aumento da concentração de cisplatina teve efeito significativo na quantidade de células sozinhas (Figura 20D) apenas em Berenice ($p < 0,01$) e em Colombiana ($p < 0,01$), não tendo diferença significativa em células não infectadas ($p = 0,108$).

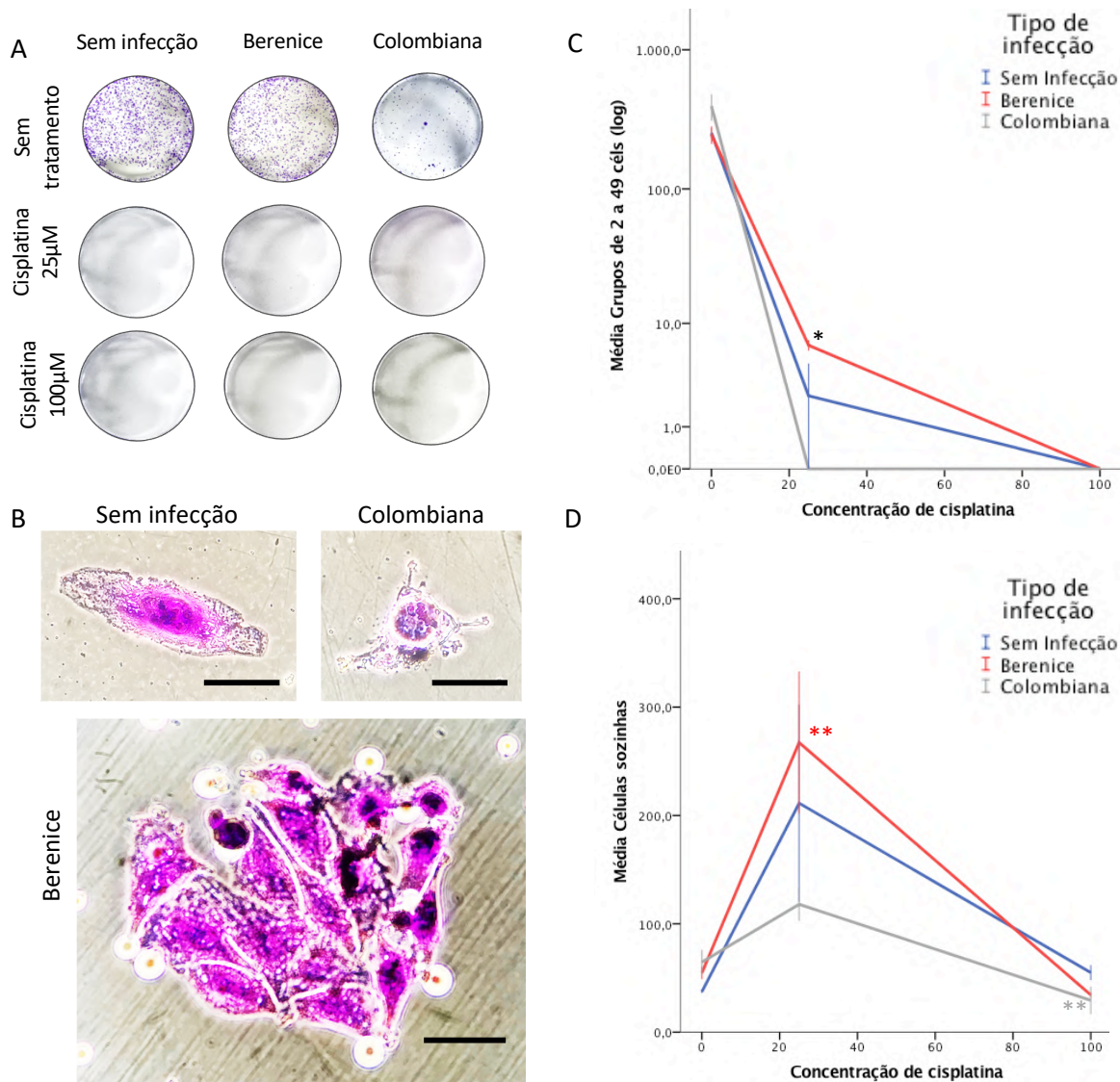


Figura 20. Proliferação celular em grupos tratados com cisplatina, infectados ou não pelo *Trypanosoma cruzi*. A) Foto dos poços do ensaio de proliferação, corados com cristal violeta. Note que não há formação de colônias no tratamento com cisplatina (25µM e 100µM). B) Foto de células sozinhas sem infecção e infectadas com *T. cruzi* Colombiana, e foto de grupamento de 18 células no grupo infectado por Berenice. A barra de escala corresponde a 100µm. C) Número médio de grupos de 2 a 49 células em relação à concentração de cisplatina (µM). D) Número médio de células sozinhas em relação à concentração de cisplatina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A análise de proliferação celular mediante avaliação do ciclo celular (Figura 21) das culturas tratadas com cisplatina, verificou que, imediatamente após o tratamento (12h após o início do tratamento), existe uma menor quantidade de células infectadas pela cepa Colombiana na fase G1, ou seja, há um aumento de células na fase S-G2, fato verificado apenas na concentração de 100µM da droga ($p < 0,05$). Nos dois outros grupos, a concentração de cisplatina não exerceu influência no ciclo celular nas primeiras 12h (Figura 21A). Entretanto, após 24h do início do tratamento (12h de tratamento + 12h de recuperação), observa-se uma

parada no ciclo celular (queda na quantidade de células na fase G1) com concentração baixa (25 μ M) nos três grupos. De interesse, o aumento na concentração leva a um aumento na quantidade de células na fase G1 (Figura 21B). O perfil apresenta provavelmente um modelo cúbico ($p < 0,001$), onde há significância apenas nos pontos 25 ($p < 0,01$) (e os demais) e entre 75 e 50 ($p < 0,05$). Teste de regressão linear mostra uma relação linear apenas para o grupo sem infecção ($p < 0,01$).

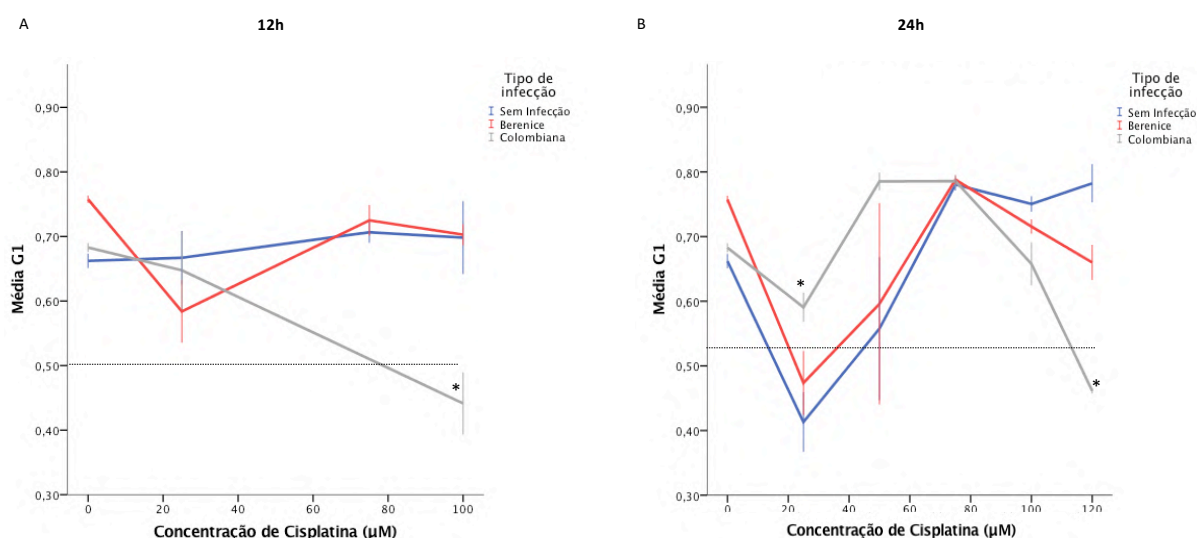


Figura 21. Quantidade de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, na fase G1 em relação à concentração de cisplatina. A) Células avaliadas imediatamente após o fim do tratamento (12h) B) Células avaliadas 24h após o início do tratamento. A linha tracejada corresponde a 50% das células avaliadas. Se G1 está abaixo da linha, significa que a maior parte das células estão em S-G2. * $p < 0,05$

O tratamento com cisplatina 25 μ M levou a um aumento no tamanho celular nas culturas não infectadas ($p < 0,05$) e em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana ($p < 0,05$) (Figura 22A). As células maiores apresentaram um aspecto alargado e achatado (Figura 22B). As células infectadas com Berenice não apresentaram diferença significativa no diâmetro de Feret entre antes e depois do tratamento (Figura 22A). O diâmetro de Feret foi calculado 7 dias após o tratamento.

Nas 4h e 12h do tratamento com cisplatina 25 μ M, não se encontra diferença significativa no perfil de ciclo celular entre os grupos. Já após o período de recuperação (24h), existe diferença significativa no ciclo celular de células infectadas com a cepa Colombiana em relação a células não infectadas, onde Colombiana apresenta mais células na fase G1 ($p < 0,05$). De fato, percebe-se que, ao longo do tempo, células tratadas com cisplatina 25 μ M tendem a diminuir o número de células na fase G1, ou seja, tende a uma parada no ciclo celular (Figura

22C e D). A análise de regressão linear mostra que essa relação existe para o grupo sem infecção ($p < 0,001$) e para o grupo infectado com *T. cruzi* Berenice ($p < 0,01$). Para células infectadas com Colombiana, essa relação não existe ($p = 0,209$), ou seja, não há parada do ciclo celular.

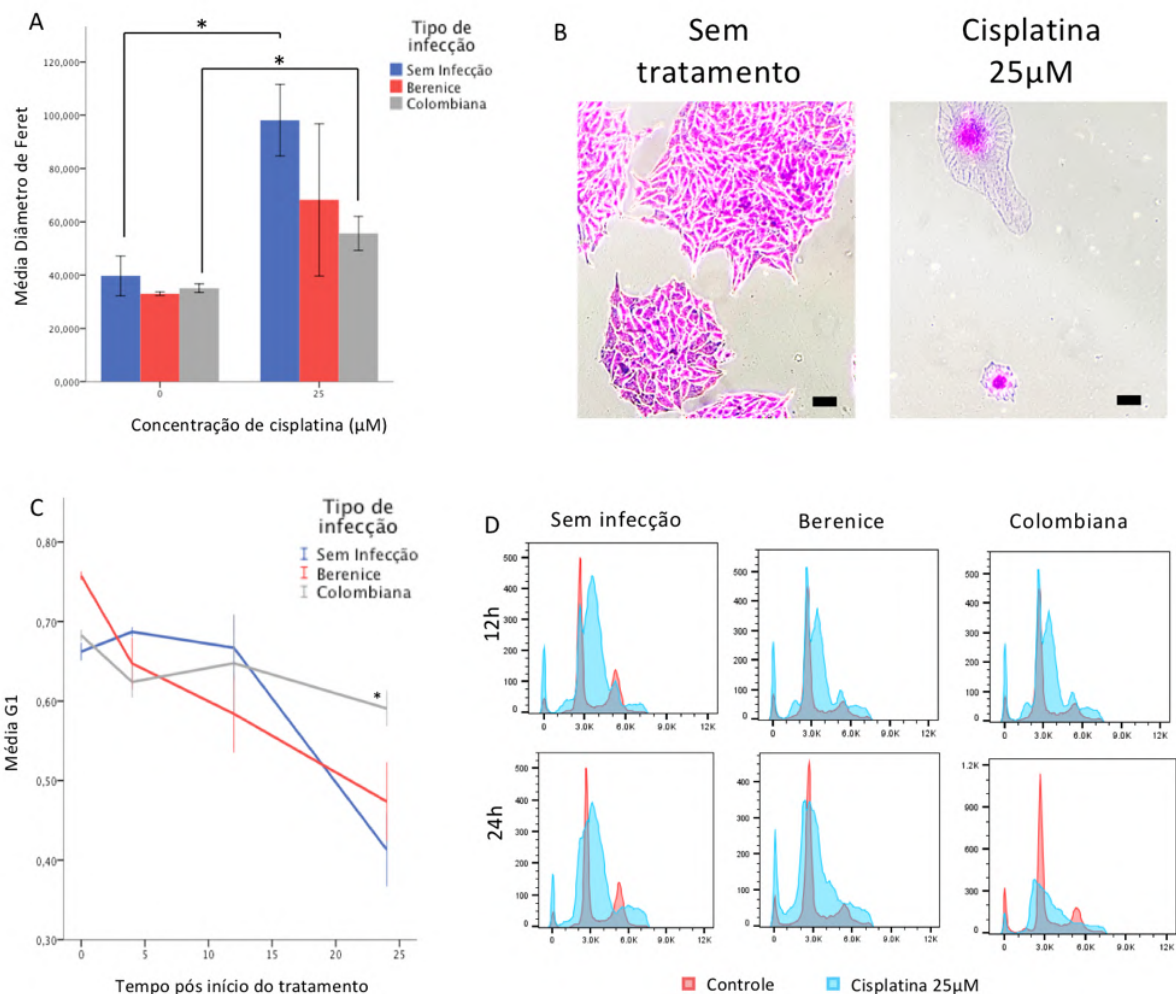


Figura 22. Proliferação e morfologia de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Cisplatina 25µM. A) Diâmetro de Feret médio em células sem tratamento e tratadas com cisplatina 25µM. B) Micrografia óptica de células não infectadas sem tratamento e tratadas com cisplatina 25µM, avaliadas 7 dias após tratamento e coradas com cristal violeta. A barra de escala corresponde a 100µm. C) Proporção média de células em fase G1 em comparação com o tempo após início do tratamento de cisplatina 25µM. D) Histograma da fluorescência de iodeto de propídeo mostrando ciclo celular antes (vermelho) e após (azul) tratamento com cisplatina 25µM. * $p < 0,05$

Quando avaliadas culturas tratadas a 100µM, percebe-se que não houve proliferação em nenhum dos grupos, apenas células isoladas. Não há diferença significativa na quantidade de células entre os tipos de infecção ($p = 0,152$) e nem no diâmetro de Feret. L6 infectadas por *T. cruzi* Colombiana apresentaram uma maior quantidade de células na fase S/G2 ($p < 0,01$)

imediatamente após o tratamento com cisplatina (12h) (Figura 23A e B). Às 24h, apesar de uma ligeira quantidade maior de células na fase G2 em Colombiana, estatisticamente não foi encontrada diferenças significativas quanto ao ciclo celular entre os grupos. A regressão apontou que não existe relação linear entre o tempo pós início do tratamento e o ciclo celular, mas a infecção por Colombiana estabeleceu uma relação que assume um modelo quadrático ($p < 0,01$) (Figura 23C).

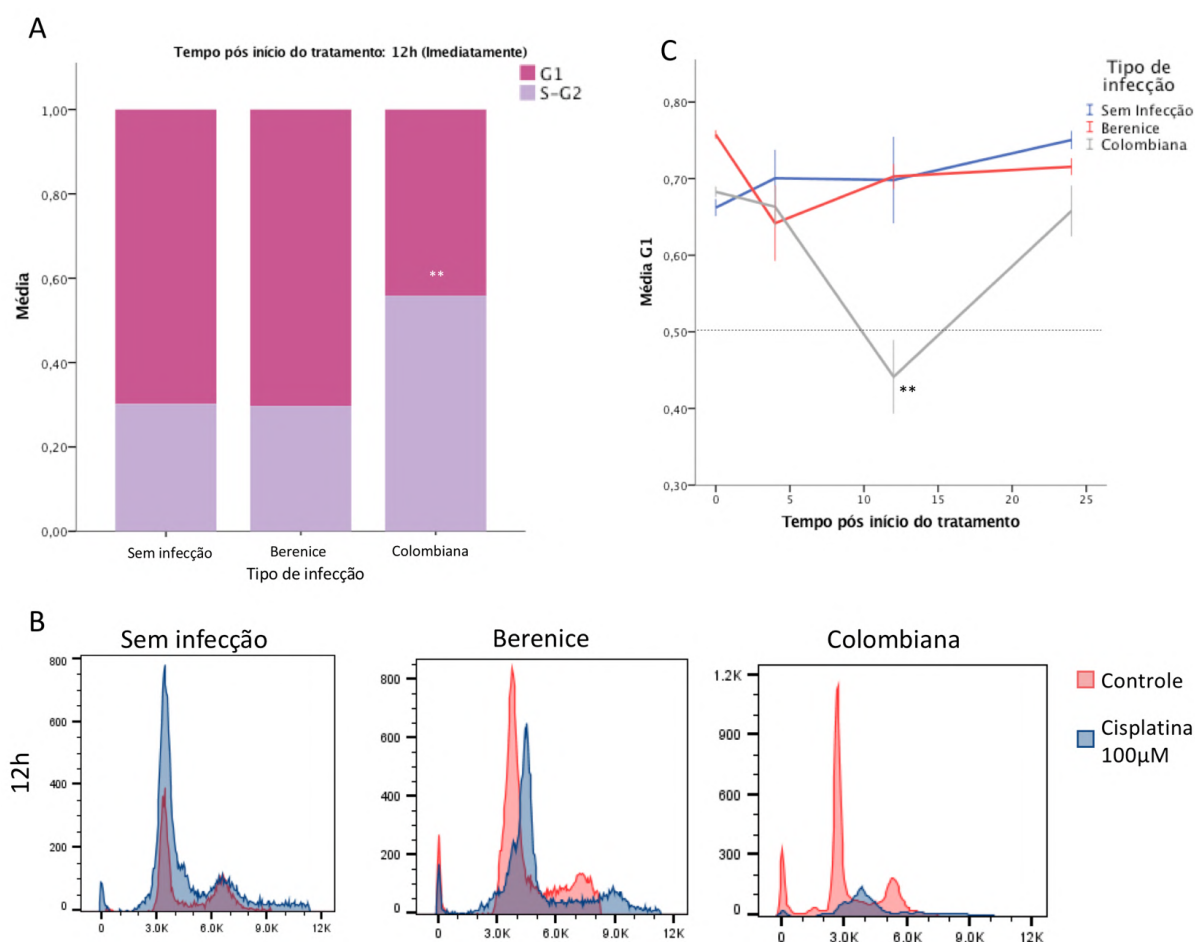


Figura 23. Ciclo celular com tratamento de Cisplatina 100µM em células L6 infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*. A) Porcentagem de células em fase G1 e S/G2 imediatamente após tratamento com cisplatina. B) Histograma de fluorescência de iodeto de propídeo mostrando ciclo celular antes (vermelho) e após (azul) tratamento com cisplatina 100µM, imediatamente ao final do tratamento. C) Proporção média de células em fase G1 em comparação com o tempo após início do tratamento de cisplatina 100µM. ** $p < 0,01$

3.2.5 Efeito na expressão de genes

3.2.5.1 Genes relacionados à mortalidade celular

Para avaliarmos a mortalidade celular nos diferentes grupos experimentais, inicialmente avaliamos a expressão do gene *Bcl2* (Figura 24), um gene anti apoptótico. Só é possível

observar redução de *Bcl2* no tratamento com 100 μ M de cisplatina; o tratamento com 25 μ M apresentou níveis de expressão semelhantes aos do controle (não infectado e não tratado). Após 4h de exposição à cisplatina na concentração de 100 μ M, verificamos uma diminuição generalizada na expressão desse gene quando comparada com a do controle. Entretanto, uma diferença significativa só foi confirmada nos grupos infectados com a cepa Berenice ($p<0,05$). Após 12h de submissão à droga, esse mesmo efeito passou a ser observado nas culturas infectadas pela cepa Colombiana ($p<0,05$). De interesse, as culturas infectadas com a cepa Berenice mantiveram uma expressão reduzida de *Bcl2*, de maneira significativa na concentração 100 μ M de cisplatina. Em células não infectadas, essa redução na expressão de *Bcl2* foi significativa apenas mais tarde, nas 24h após o início do tratamento (12h de tratamento + 12h de recuperação; $p<0,05$). Desta forma, após o período de recuperação, os grupos experimentais passaram a se comportar de maneira igual quanto à expressão de *Bcl2*, não havendo diferença estatística entre eles.

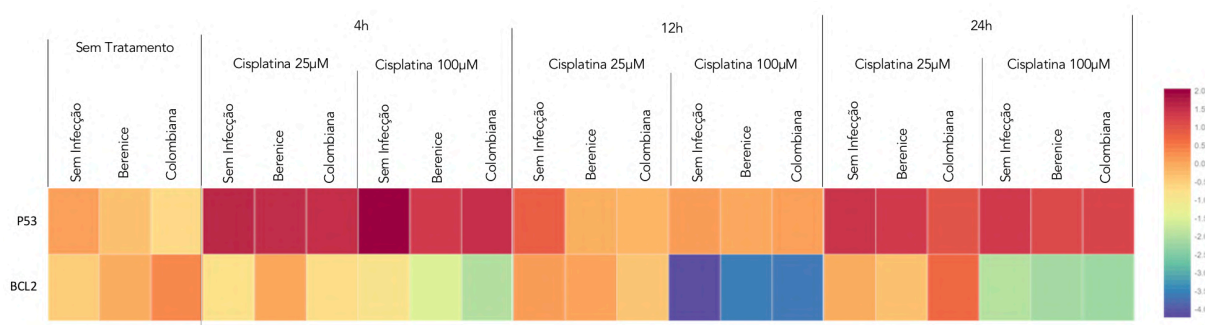


Figura 24. Expressão de *Bcl2* e *P53* de células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, e tratadas com cisplatina. A) *Heatmap* do resultado da RT-qPCR apontando maior (vermelho) ou menor (azul) expressão de BCL2 e p53 em comparação ao calibrador (controle não infectado e não tratado).

Em relação à *P53* (Figura 24), desde as primeiras 4h do início do tratamento, células infectadas com Berenice e Colombiana registraram aumento significativo na expressão deste gene ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente), que ficou mais evidente com o aumento da concentração de cisplatina. Curiosamente, verificou-se o retorno da expressão de *P53* para níveis basais imediatamente após o tratamento (tempo 12h) com a concentração de 25 μ M. O aumento na expressão de *P53* só foi significativo em células não infectadas nas 24h após o início do tratamento (12h de tratamento + 12h de recuperação). Neste período, *P53* está mais expresso em todos os grupos, sem diferença estatística entre eles.

3.2.5.2 Genes envolvidos no reparo de DNA

O tratamento com cisplatina levou à alteração de diversos genes envolvidos no reparo de DNA, com algumas peculiaridades em células infectadas, dependendo do tipo de cepa (Figura 25). Nas primeiras 4h de tratamento com cisplatina, nas concentrações de 25 e 100 μ M, observou-se um aumento na expressão de *Rad51* ($p < 0,01$) em todos os grupos. No entanto, em células não infectadas, a expressão de *Rad51* é significativamente maior que em células com *T. cruzi* ($p < 0,05$). No tratamento com cisplatina 25 μ M, células sem infecção apresentam maior expressão de *Rad51* em todos os tempos avaliados (Figura 26B). Nesta concentração, o pico na expressão de *Rad51* ocorre imediatamente após o tratamento com cisplatina, às 12h. Após o período de recuperação, observa-se uma redução relativa na expressão de *Rad51*, mas apenas células infectadas com a cepa Colombiana retornam para o nível basal de expressão. No tratamento com cisplatina 100 μ M, a expressão aumentada de *Rad51* se mantém ao longo do tempo, sem pico às 12h.

Quanto à expressão de *Atm*, encontra-se alterações significativas na expressão deste gene em células não infectadas apenas no tratamento com cisplatina 25 μ M (Figura 26A). No tratamento mais intenso, 100 μ M, células não infectadas não apresentam mudanças estatisticamente relevantes na expressão de *Atm* em nenhum período (Figura 27A). No período inicial de tratamento (4h), apenas células infectadas com a cepa Berenice apresentaram aumento significativo na expressão de *Atm* ($p < 0,001$), em ambas as concentrações (25 μ M e 100 μ M), e manteve-se aumentado até o final do tratamento com cisplatina 25 μ M (tempo 12h). Aos 100 μ M, os níveis de *Atm* em Berenice retornam aos basais às 12h (Figura 27A). O aumento na expressão de *Atm* foi perceptível em células não infectadas apenas após 12h de tratamento com cisplatina 25 μ M, onde a expressão foi significativamente maior que a de células infectadas ($p < 0,05$). Células infectadas com *T. cruzi* Colombiana não apresentaram aumento na expressão de *Atm* em nenhum momento no tratamento com cisplatina (25 μ M ou 100 μ M). Após o período de recuperação, verifica-se que a expressão de *Atm* retorna aos níveis basais em células não infectadas e infectadas com a cepa Berenice, mas, em células infectadas por Colombiana, há uma redução significativa na expressão de *Atm* ($p < 0,05$), nas concentrações de 25 μ M e 100 μ M.

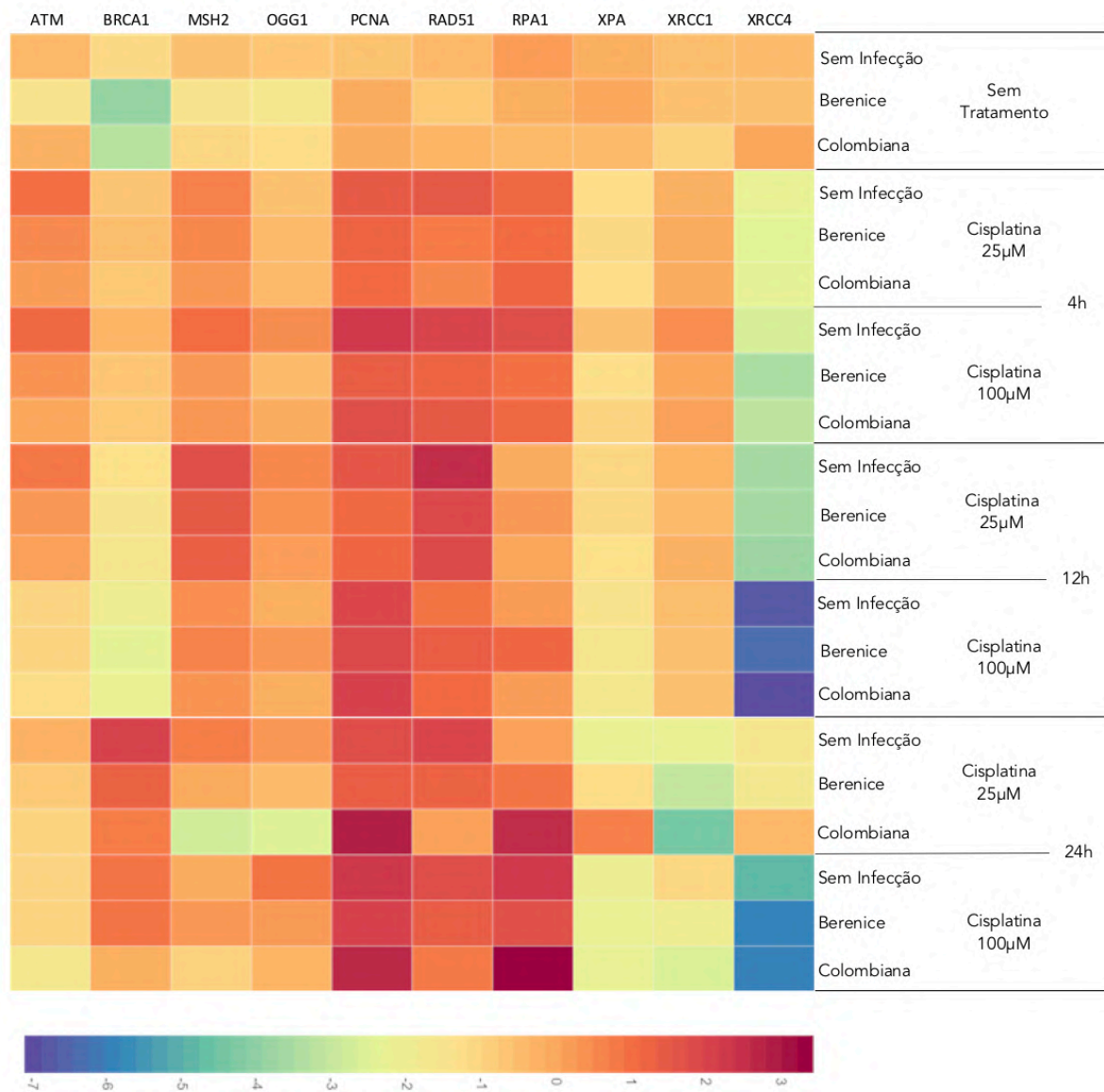


Figura 25. Expressão de genes de reparo em células tratadas com cisplatina, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*. A) *Heatmap* do resultado da RT-qPCR apontando maior (vermelho) ou menor (azul) expressão de genes

Em relação à expressão de *Brcal*, só foi detectada alteração após o período de recuperação do tratamento com cisplatina 25µM (Figura 26C) ou 100µM (Figura 27B), com aumento significativo ($p < 0,01$) em células sem infecção e infectadas com *T. cruzi* Berenice. Ressalta-se que células não infectadas expressam significativamente mais *Brcal* que células infectadas no tratamento com cisplatina 25µM. Em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana, não houve diferença estatística na expressão desse gene em nenhuma condição.

Em todos os grupos, há aparente redução na expressão de *Xrcc4* com o tratamento com cisplatina, no entanto, esta só é significativa em células não infectadas ($p < 0,001$).

Interessantemente, em células infectadas por *T. cruzi* Colombiana, às 24h, é expressa a quantidade basal de *Xrcc4* no tratamento com cisplatina 25 μ M.

Quanto ao gene *Pcna*, observa-se, nas primeiras horas de tratamento com cisplatina 25 μ M, que todos os grupos apresentaram um aumento em sua expressão ($p < 0,05$), e este se mantém aumentado ao longo do tempo (Figura 26D). No tratamento mais intenso (100 μ M), apenas células com a cepa Colombiana apresentam aumento significativo na expressão deste gene nas primeiras 4h, os demais grupos registraram aumento às 12h (Figura 27D). Imediatamente após o fim do tratamento (12h) com cisplatina 25 μ M, as células não infectadas apresentam expressão significativamente maior de *Pcna* comparada com células infectadas. Células infectadas com *T. cruzi* Colombiana, curiosamente, apresentam superexpressão de *Pcna* ($p < 0,05$) após o período de recuperação do tratamento com ambas as concentrações de cisplatina.

Apenas células infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentaram aumento significativo na expressão de *Msh2* ($p < 0,001$) nas primeiras 4h de tratamento com cisplatina, nas concentrações de 25 μ M (Figura 26E) e 100 μ M (Figura 27C). Células não infectadas e infectadas com Colombiana apresentaram aumento na expressão de *Msh2* ($p < 0,001$) apenas 12h após o início do tratamento com cisplatina 25 μ M, para não infectadas, e 25 e 100 μ M, para as infectadas com a cepa Colombiana. Na concentração de 100 μ M, células sem infecção não alteram a expressão de *Msh2* ao longo do tempo. Interessantemente, em todos os grupos, imediatamente após o tratamento (12h), a cisplatina 25 μ M induziu a uma maior expressão de *Msh2* que no tratamento mais intenso (100 μ M). Chama atenção as células infectadas pela cepa Colombiana que apresentam menor expressão de *Msh2* que as não infectadas em todos os tempos de tratamento. Após o período de recuperação, inclusive, há redução significativa na expressão de *Msh2* pelas células infectadas por Colombiana ($p < 0,05$), tanto no tratamento 25 μ M como em 100 μ M.

A expressão de *Rpa1* é alterada de acordo com o aumento na concentração de cisplatina, apenas em células infectadas, com aumento da expressão nas primeiras 4 horas do tratamento ($p < 0,05$ em Berenice e $p < 0,01$ em Colombiana). Neste período inicial de tratamento, células infectadas apresentam também redução na expressão de *Xpa* ($p < 0,01$ em Berenice e $p < 0,05$ em Colombiana), independentemente da concentração da droga utilizada.

O aumento na expressão de *Ogg1*, no tratamento com cisplatina, só é significativo a partir das 12h ($p < 0,05$), para todos os grupos tratados com a concentração de 25 μ M (Figura 29F). Após o período de recuperação, os grupos sem infecção e infectados com *T. cruzi* Berenice mantêm a expressão aumentada, enquanto em células infectadas com a cepa Colombiana, há redução significativa na expressão de *Ogg1* no tratamento com cisplatina

25µM (p<0,01). Neste período, no tratamento com cisplatina 25µM, células não infectadas apresentam este gene mais expresso que nos demais grupos (p<0,01). Não há diferença significativa da expressão de *Ogg1* no tratamento com cisplatina 100µM.

Apenas células infectadas apresentam alteração na expressão de *Xrcc1* (p<0,05 para ambas as cepas). Nas primeiras 4h, há um aumento significativo na expressão deste gene em células infectadas, seguida pela normalização nos níveis basais nas horas seguintes (Figura 27E). Após o período de recuperação (24h), no entanto, as células infectadas apresentam menor expressão de *Xrcc1* em comparação a células não tratadas (p<0,05), e a cepa Colombiana apresenta expressão significativamente menor que células sem infecção (p<0,01).

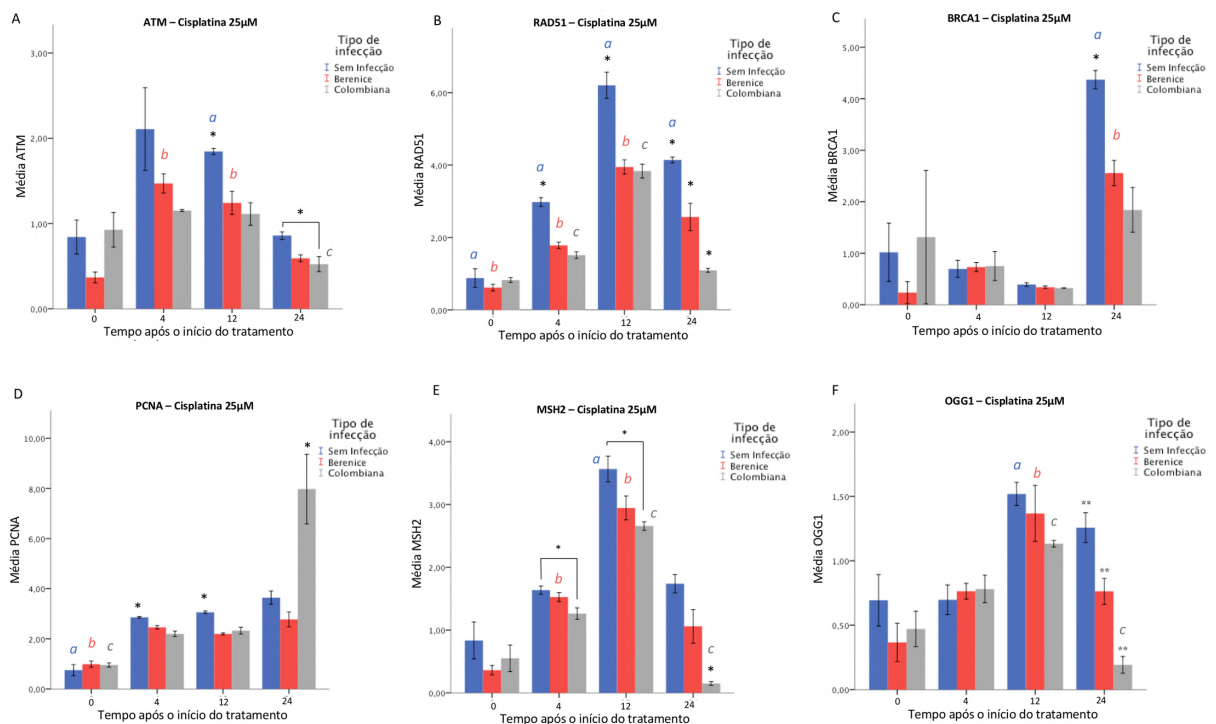


Figura 26. Expressão de genes de reparo em células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Cisplatina 25µM. Expressão de A) *Atm*; B) *Rad51*; C) *Brcal*; D) *Pcna*; E) *Msh2*; e F) *Ogg1* em diferentes tempos após tratamento. Tempo representado em horas (h). *p<0,05; **p<0,01. a: estatística referente a células sem infecção (p<0,05); b: estatística referente a células infectadas com a cepa Berenice (p<0,05); c: estatística referente a células infectadas pela cepa Colombiana (p<0,05).

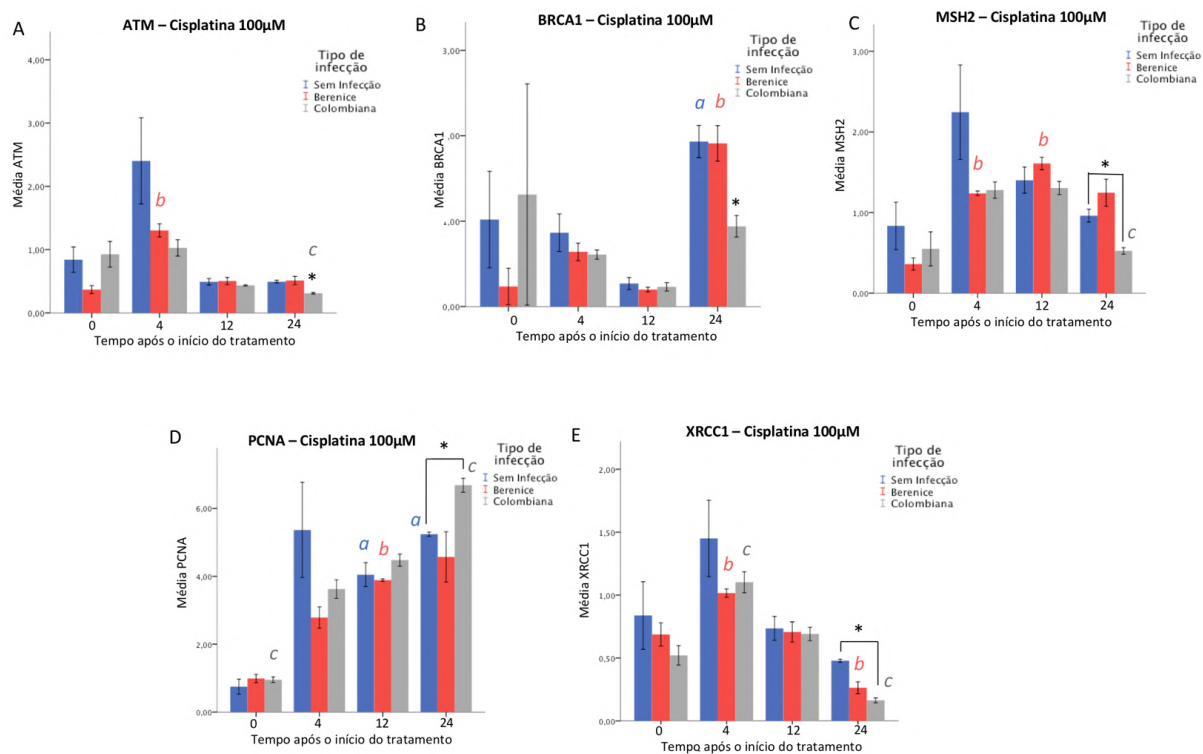


Figura 27. Expressão de genes de reparo em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Cisplatina 100µM. Expressão de A) *Atm*; B) *Brcal*; C) *Msh2*; D) *Pcna*; e E) *Xrcc1* em diferentes tempos após tratamento. Tempo representado em horas (h). * $p < 0,05$. *a*: estatística referente a células sem infecção ($p < 0,05$); *b*: estatística referente a células infectadas com a cepa Berenice ($p < 0,05$); *c*: estatística referente a células infectadas pela cepa Colombiana ($p < 0,05$).

3.2.5.3 Expressão do retroelemento LINE-1

O tratamento com cisplatina não levou a alteração na expressão da ORF 2 (transcriptase reversa) de LINE-1 em células não infectadas e infectadas com Berenice. Em células com *T. cruzi* Colombiana, no entanto, há aumento relativo e significativo ($p < 0,01$) da expressão da ORF2 de LINE-1 durante a recuperação do tratamento, em ambas as concentrações de cisplatina (Figura 28).

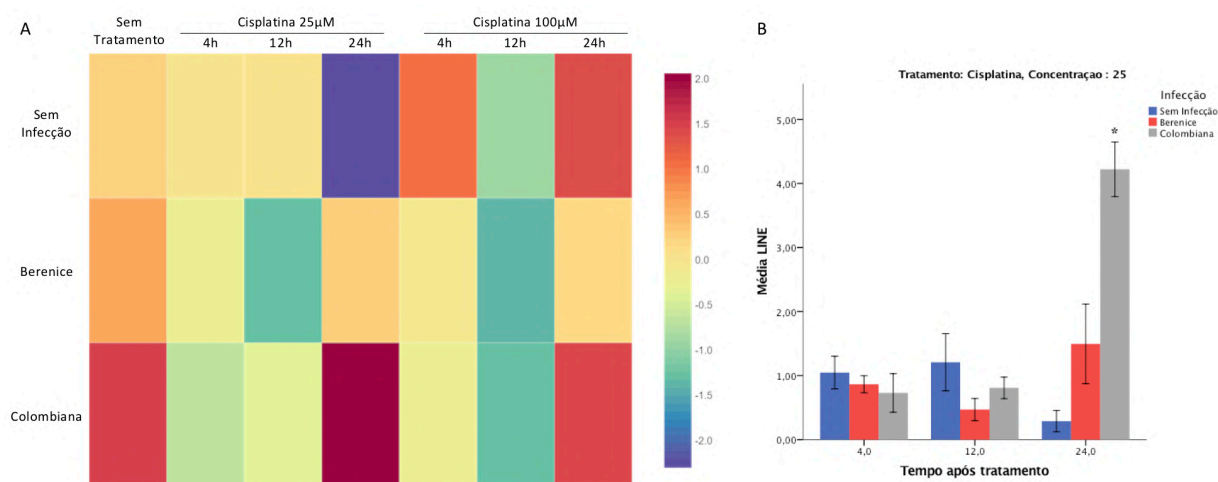


Figura 28. Expressão da transcriptase reversa do retroelemento LINE-1 em células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, tratadas com cisplatina. A) *Heatmap* da expressão do retroelemento LINE-1 no tratamento com cisplatina. B) Expressão de LINE1 no tratamento com cisplatina 25µM. * p<0,05.

3.2.5.4 Genes de proliferação e senescência

Observa-se, desde as primeiras 4h de tratamento com cisplatina 25µM e 100µM, um aumento significativo na expressão de *P21*, um gene relacionado ao controle do ciclo celular e envolvido na senescência (Figura 29). Especificamente no tratamento a 25µM (Figura 30A), células não infectadas tem *P21* mais expresso que em células infectadas com *T. cruzi*. Nas horas seguintes (tempo de 12h), há uma redução significativa na expressão de *P21*. Após o período de recuperação, células sem infecção apresentaram superexpressão de *P21* (p<0,05), enquanto células infectadas com *T. cruzi* Colombiana apresentaram redução significativa na expressão deste gene, se igualando aos níveis basais. No tratamento mais intenso (100µM), não há diferença na expressão de *P21* entre células infectadas com *T. cruzi* e não infectadas (Figura 29).

Em células não infectadas, o tratamento com cisplatina 25µM levou a uma redução relativa da expressão de *P16* ao longo do tempo (p<0,01). Não houve alteração significativa de *P16* no tratamento com cisplatina em células infectadas com *T. cruzi* Berenice. Em células infectadas por *T. cruzi* Colombiana, no entanto, há significativo aumento de expressão de *P16* após a recuperação do tratamento com cisplatina 25µM (p<0,001) e 100µM (p<0,05) (Figura 30C).

O marcador de proliferação celular *Ki67* apresentou redução significativa de expressão (Figura 29), conforme aumento da concentração de cisplatina, apenas em células infectadas com *T. cruzi* (p<0,05), tanto Berenice como Colombiana, desde as 4 primeiras horas de tratamento. Em nenhum tempo, a concentração teve efeito significativo na expressão de *Ki67*

em células não infectadas. Interessantemente, quando analisadas 24h após o tratamento com cisplatina 25 μ M, células infectadas com *T. cruzi* Colombiana apresentaram aumento significativo na expressão de *Ki67* ($p < 0,01$) (Figura 30B).

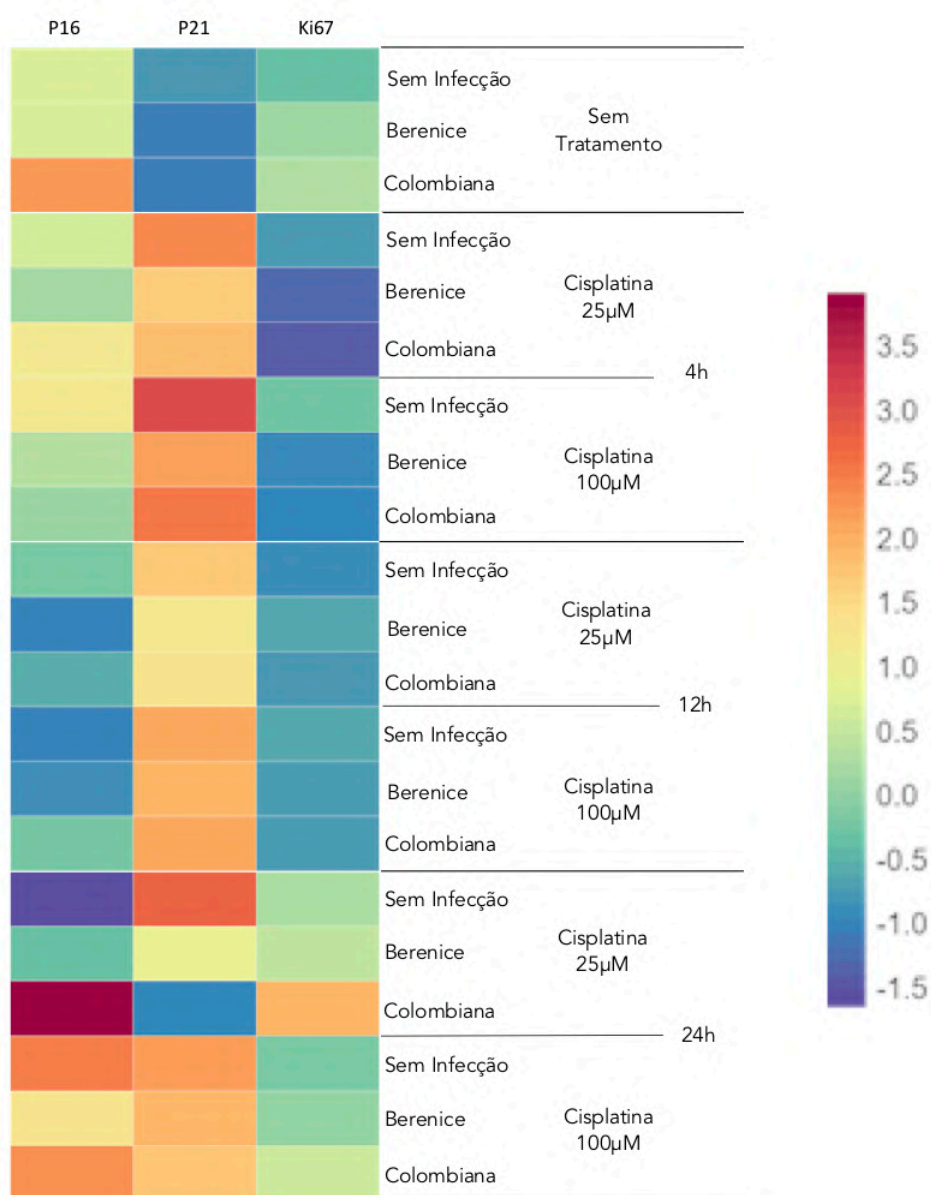


Figura 29. Expressão de *P16*, *P21* e *Ki67* de células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, e tratadas com cisplatina. *Heatmap* do resultado da RT-qPCR apontando maior (vermelho) ou menor (azul) expressão de *P16*, *P21* e *Ki67* em comparação ao calibrador.

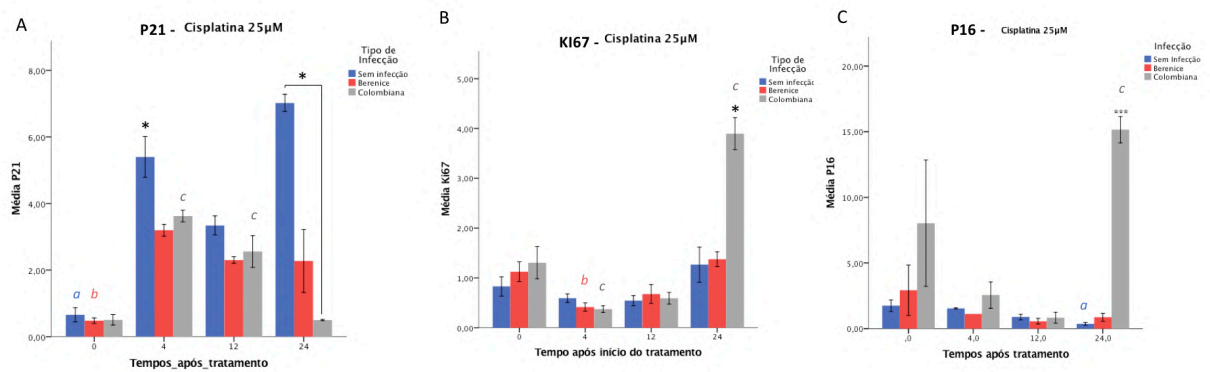


Figura 30. Expressão de genes relacionados com senescência e proliferação celular em culturas de L6, tratadas com cisplatina 25µM, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*. Expressão de A) *P21*; B) *Ki67*; e C) *P16* em diferentes tempos pós tratamento. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. a: estatística referente a células sem infecção ($p < 0,05$); b: estatística referente a células infectadas com a cepa Berenice ($p < 0,05$); c: estatística referente a células infectadas pela cepa Colombiana ($p < 0,05$).

3.2.5.5 Testes de Correlação de Expressão Gênica

Para avaliar o perfil de expressão gênica de genes relacionados à mesma via, foram feitos testes de correlação para cada tipo de infecção, em diferentes tempos de tratamento, ou em diferentes concentrações. Para células infectadas com a cepa Berenice, foi encontrada correlação na expressão de genes relacionados à HR: *Atm* e *Brcal* (coeficiente de correlação=0,683; $p < 0,05$) e *Atm* e *Rad51* (coeficiente de correlação=0,843; $p < 0,01$), às 4h, *Atm* e *Rad51* (coeficiente de correlação=0,691; $p < 0,05$), e *Rad51* e *Brcal* (coeficiente de correlação = 0,814; $p < 0,01$), às 24h, com o aumento de concentração. Já para células não infectadas, houve correlação apenas às 4h, entre *Atm* e *Rad51* (coeficiente de correlação=0,827; $p < 0,01$), e em células infectadas com Colombiana, a relação entre *Atm* e *Rad51* foi negativa (coeficiente de correlação=-0,734; $p < 0,05$) às 24h (Figura 31).

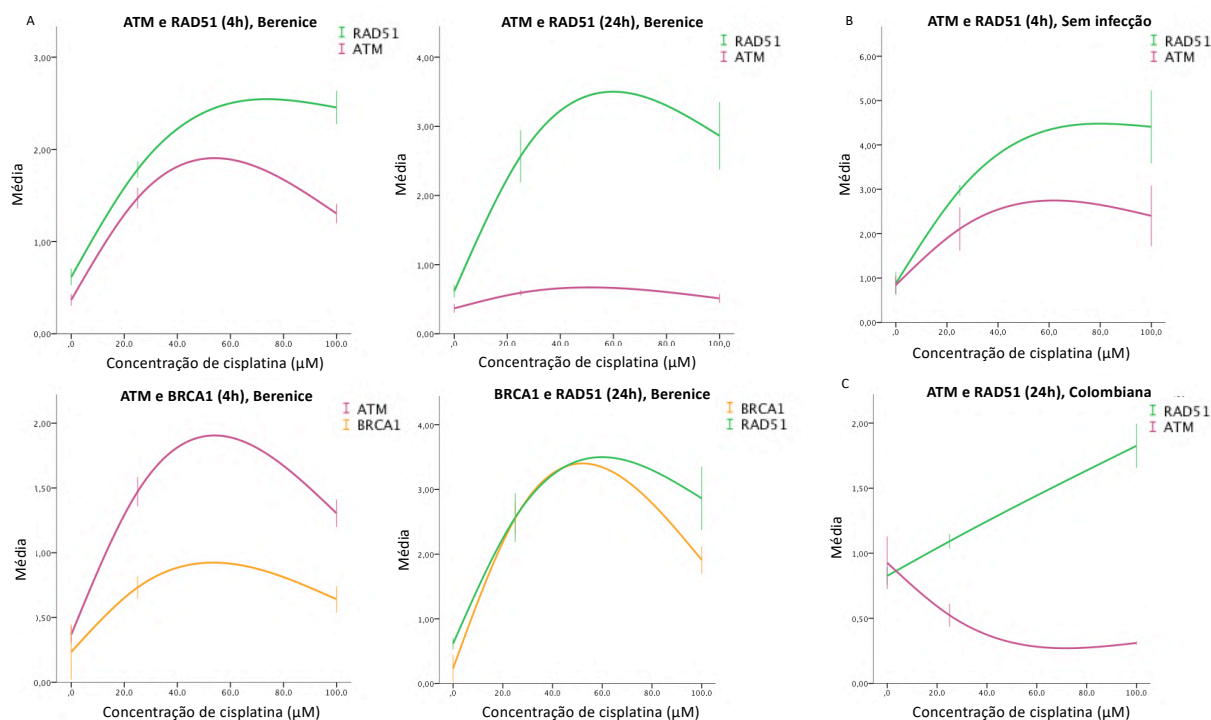


Figura 31. Correlação da expressão de genes de reparo relacionados à recombinação homóloga com o aumento da concentração de cisplatina, em células L6 infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*. A) Expressão de genes relacionados à HR em células infectadas com *T. cruzi* Berenice. B) Expressão de *Atm* e *Rad51* em células sem infecção. C) expressão de *Atm* e *Rad51* em células infectadas com a cepa Colombiana.

Foi detectada também uma relação inversamente proporcional entre *Rad51* e *Xrcc4* nos grupos sem infecção (Coeficiente de correlação: -0,763; $p < 0,01$) e infectados com *T. cruzi* Berenice (Coeficiente de correlação: -0,609; $p < 0,05$), durante tratamento com cisplatina 25 μM. Esta relação também foi encontrada para células tratadas com 100 μM infectadas com Berenice (Coeficiente de correlação: -0,729, $p < 0,01$) e com Colombiana (Coeficiente de correlação: -0,596, $p < 0,05$). E, curiosamente, para as células infectadas com a Cepa Colombiana verificou-se uma correlação positiva entre *Xrcc4* e *Brcal* (Coeficiente de correlação: 0,801; $p < 0,01$), para as duas concentrações (Figura 32).

Também foi avaliada correlação entre genes envolvidos da via BER e NER, e percebe-se que, apenas em células infectadas por Colombiana e tratadas com cisplatina 25 μM, foi visível a correlação entre os dois genes da via BER (*Xrcc1* e *Ogg1*) (Coeficiente de correlação: 0,805, $p < 0,01$), e uma relação inversamente proporcional entre *Xpa* (NER) e *Ogg1* (Coeficiente de correlação: -0,711, $p < 0,01$) e entre *Xpa* e *Xrcc1* (Coeficiente de correlação: -0,9; $p < 0,001$). Durante tratamento com cisplatina 100 μM, também foi perceptível a relação inversa entre *Xpa* e *Ogg1* em células infectadas por *T. cruzi* Berenice (Coeficiente de correlação: -0,7; $p < 0,05$) (Figura 33).

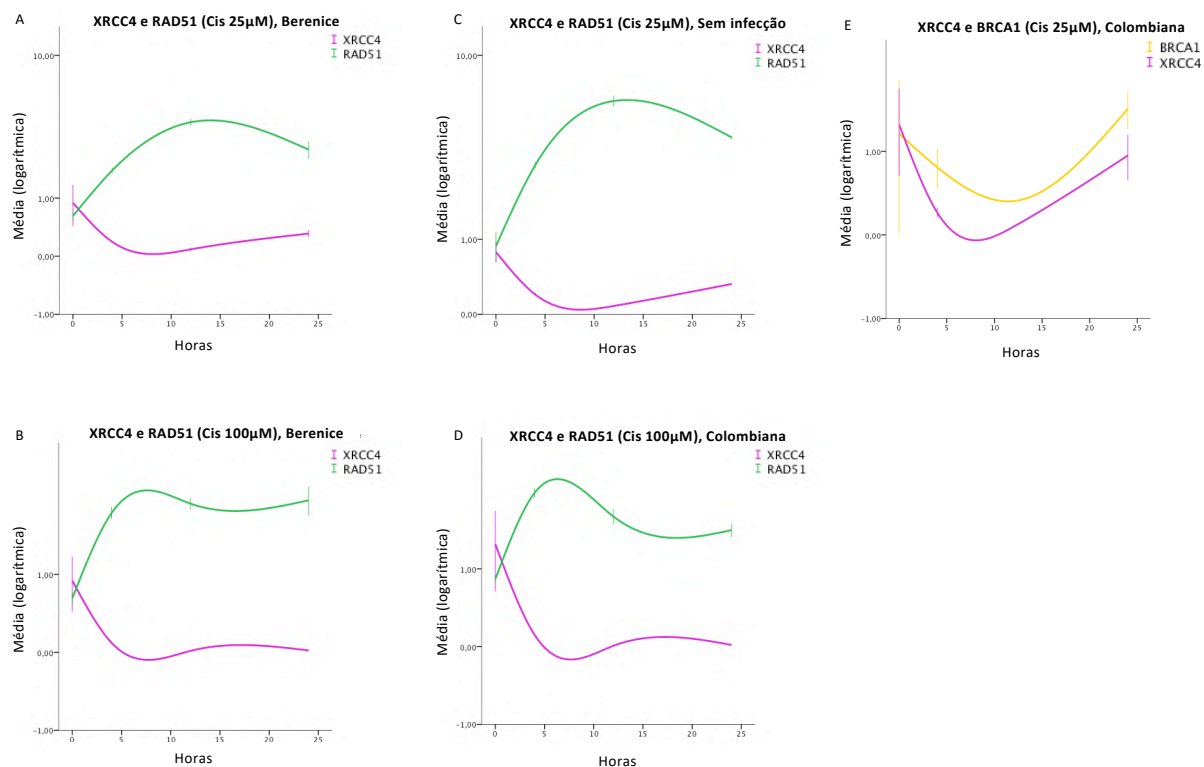


Figura 32. Correlação da expressão de *Xrcc4*, *Rad51* e *Brca1*. A) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com cisplatina 25µM. B) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com cisplatina 100µM. C) Expressão de genes em células não infectadas tratadas com cisplatina 25µM. D) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com cisplatina 100µM. E) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com cisplatina 25µM.

Interessantemente, a expressão do gene *Msh2*, da via MMR, apresentou correlação com o gene *Ogg1*, da via BER, no tratamento com cisplatina 25µM, nos três grupos, com coeficiente de correlação de Pearson maior que 0,810 ($p < 0,01$). Este gene da via MMR teve correlação negativa com *Xpa*, da via NER, apenas para células infectadas com *T. cruzi*, com coeficiente de correlação de -0,634 ($p < 0,05$) para Berenice e -0,688 ($p < 0,05$) para Colombiana. No tratamento com 100µM de cisplatina, só foi perceptível correlação em células infectadas por Berenice, apresentando relação inversamente proporcional entre *Msh2* e *Xpa* (Coeficiente de correlação: -0,853, $p < 0,001$) (Figura 33).

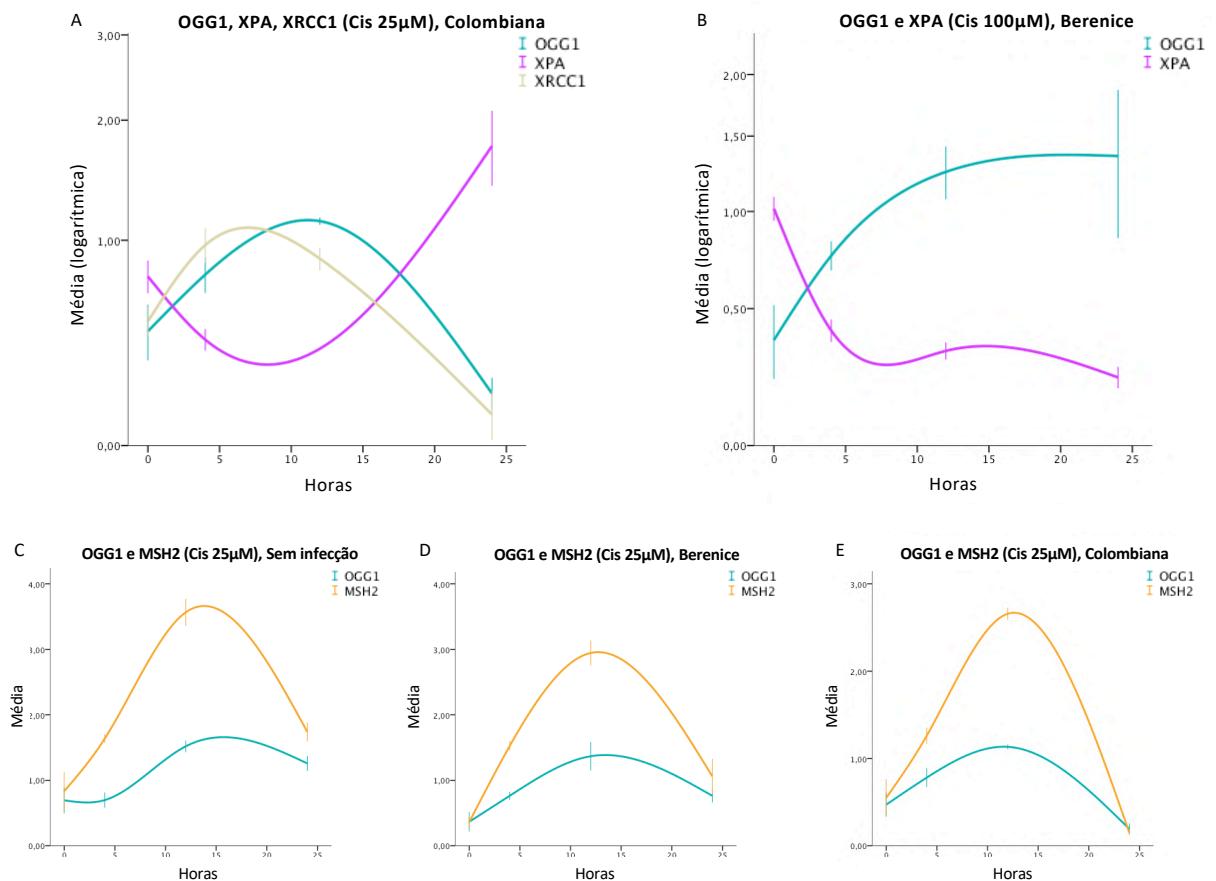


Figura 33. Correlação da expressão de genes relacionados às vias BER, NER e MMR. A) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com cisplatina 25µM. B) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com cisplatina 100µM. C) Expressão de genes em células não infectadas tratadas com cisplatina 25µM. D) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com cisplatina 25µM. E) Expressão de genes em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com cisplatina 25µM.

Também houve correlação na expressão de *Atm*, *P53* e *P21* durante tratamento com cisplatina 100µM após recuperação (24h) em células não infectadas (coeficiente de correlação: *Atm* e *P53*=0,860; $p<0,001$; *Atm* e *P21*=0,825; $p<0,01$; *P53* e *P21*=0,918; $p<0,001$) e infectadas com *T. cruzi* Berenice (coeficiente de correlação :*Atm* e *P53*=0,711; $p<0,05$; *Atm* e *P21*=0,618; $p<0,05$; *P53* e *P21*=0,714; $p<0,01$); em células infectadas com Colombiana houve correlação apenas entre *P53* e *P21* (coeficiente de correlação=0,726; $p<0,01$) (Figura 34). Foi encontrada relação inversamente proporcional entre *P16* e *P21* no tratamento com cisplatina 25µM, apenas em células sem infecção (Coeficiente de correlação: -0,640, $p<0,05$) e em células infectadas com Colombiana (Coeficiente de correlação:-0,694, $p<0,05$).

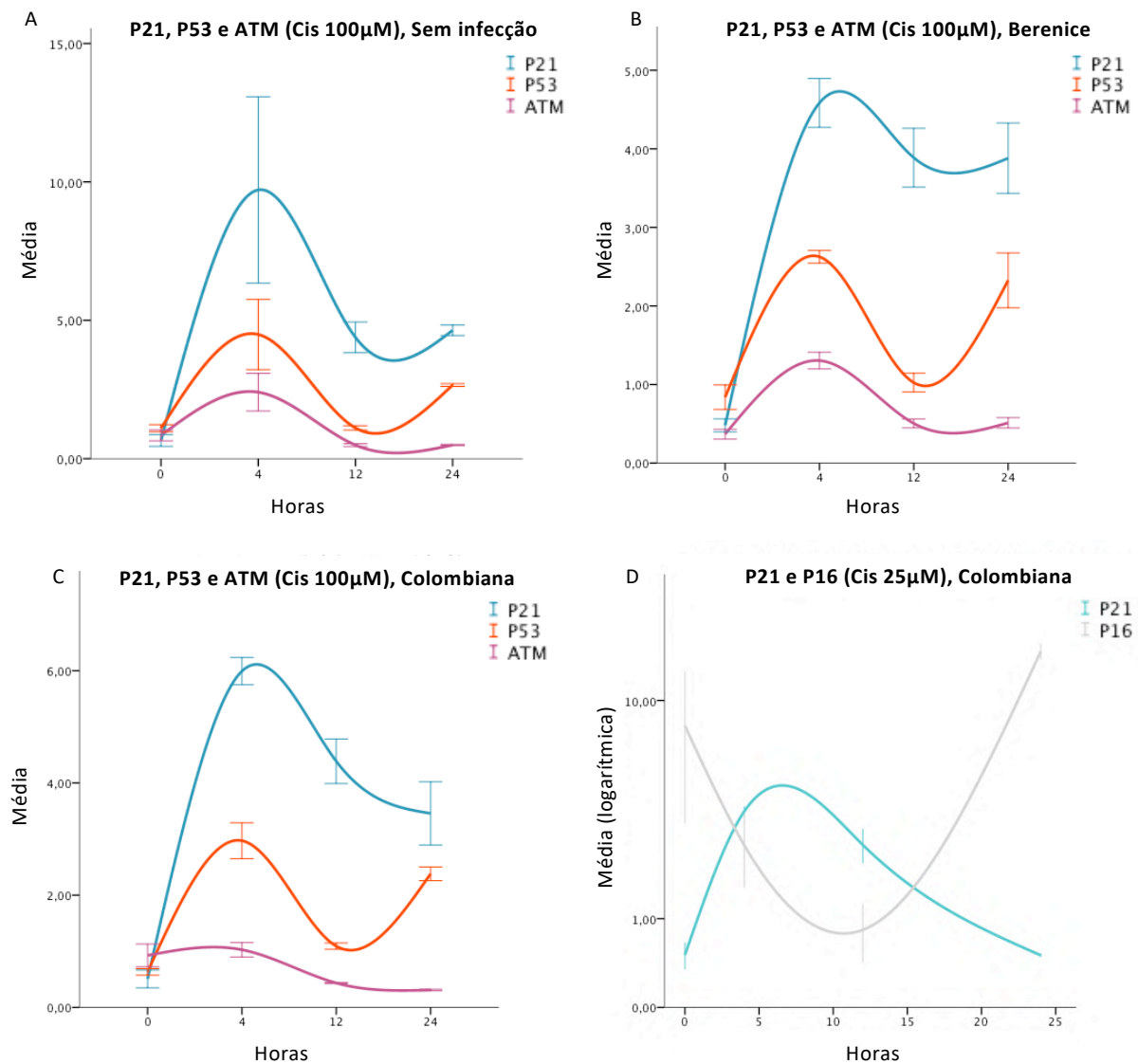


Figura 34. Correlação da expressão de *P21*, *P53* e *Atm* em células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, tratadas com cisplatina 100µM. A) Expressão de *P21*, *P53* e *Atm* em células não infectadas. Há correlação entre os três genes B) Expressão de *P21*, *P53* e *Atm* em células infectadas com *T. cruzi* Berenice. Há correlação entre os três genes C) Expressão de *P21*, *P53* e *Atm* em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana. Não há correlação entre ATM e os demais genes. D) Expressão de *P21* e *P16* em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana.

3.3 Efeito da cisplatina no *Trypanosoma cruzi*

3.3.1 Efeito da cisplatina na mortalidade do *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas foram expostas à cisplatina 100µM, nas mesmas condições de tratamento que células L6. A contagem na câmara de Neubauer mostrou que cerca de 85% dos parasitos continuaram vivos mesmo após o período de recuperação (tempo de 24h). Não houve diferença significativa entre as cepas Berenice e Colombiana (Figura 35).

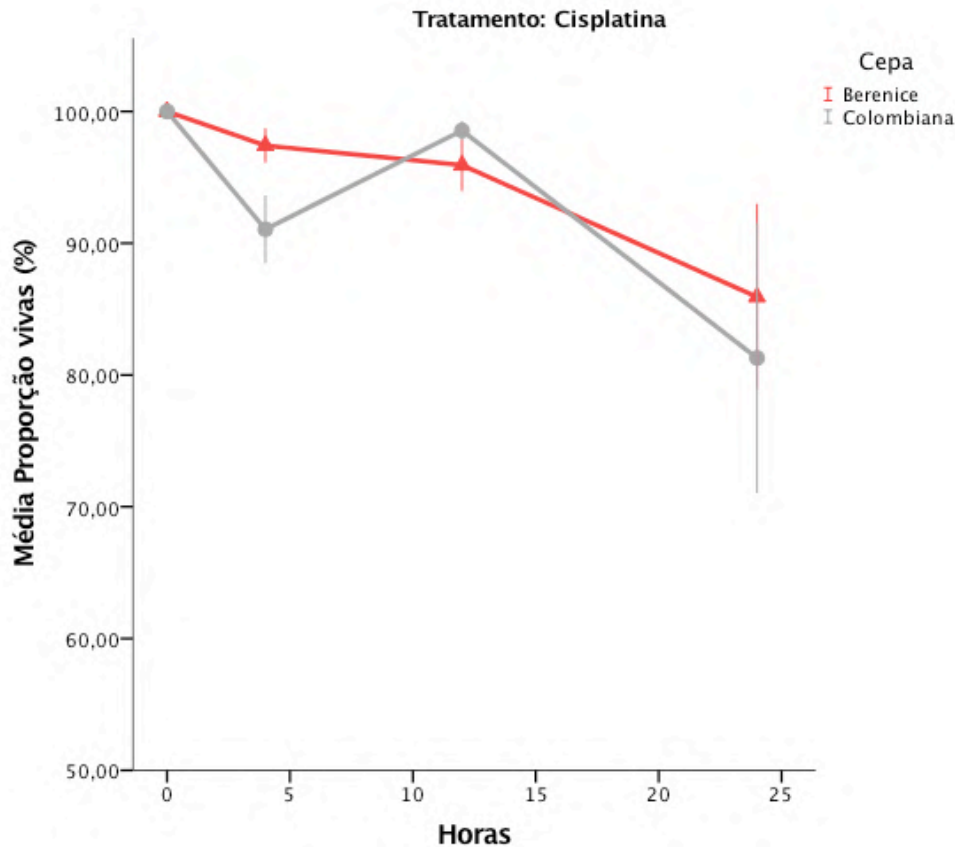


Figura 35. Curva de viabilidade de *Trypanosoma cruzi* tratados com Cisplatina 100µM.

3.3.2 Efeito da cisplatina na parasitemia de células infectadas

A partir da quantificação do gene constitutivo *Tc40S*, estimou-se a quantidade de parasitos em amostras tratadas com cisplatina ao longo do tempo (Figura 36). O tratamento com cisplatina levou a uma redução na quantidade total de *T. cruzi* Berenice nas culturas infectadas desde as primeiras 4h ($p < 0,05$). No entanto, não houve alteração significativa na quantidade dos parasitos ao longo do tempo no tratamento com cisplatina 25µM. Já após o tratamento com cisplatina 100µM, durante o período de recuperação (24h), houve uma redução na quantidade *T. cruzi* Berenice. Esta redução foi significativa quando considerada a proporção entre quantidade de parasitos por quantidade de células L6 ($p < 0,05$).

Já a cepa Colombiana apresentou um comportamento diferente após tratamento com cisplatina em células infectadas. Enquanto o tratamento com cisplatina 25µM não apresentou diferenças significativas na quantidade de parasitos em nenhum período, o tratamento mais intenso, com cisplatina 100µM, apresentou um aumento na quantidade de Colombiana, apenas

no período de recuperação (24h). Este aumento também foi detectável e significativo ($p < 0,001$) quando considerada a proporção parasito/célula L6.

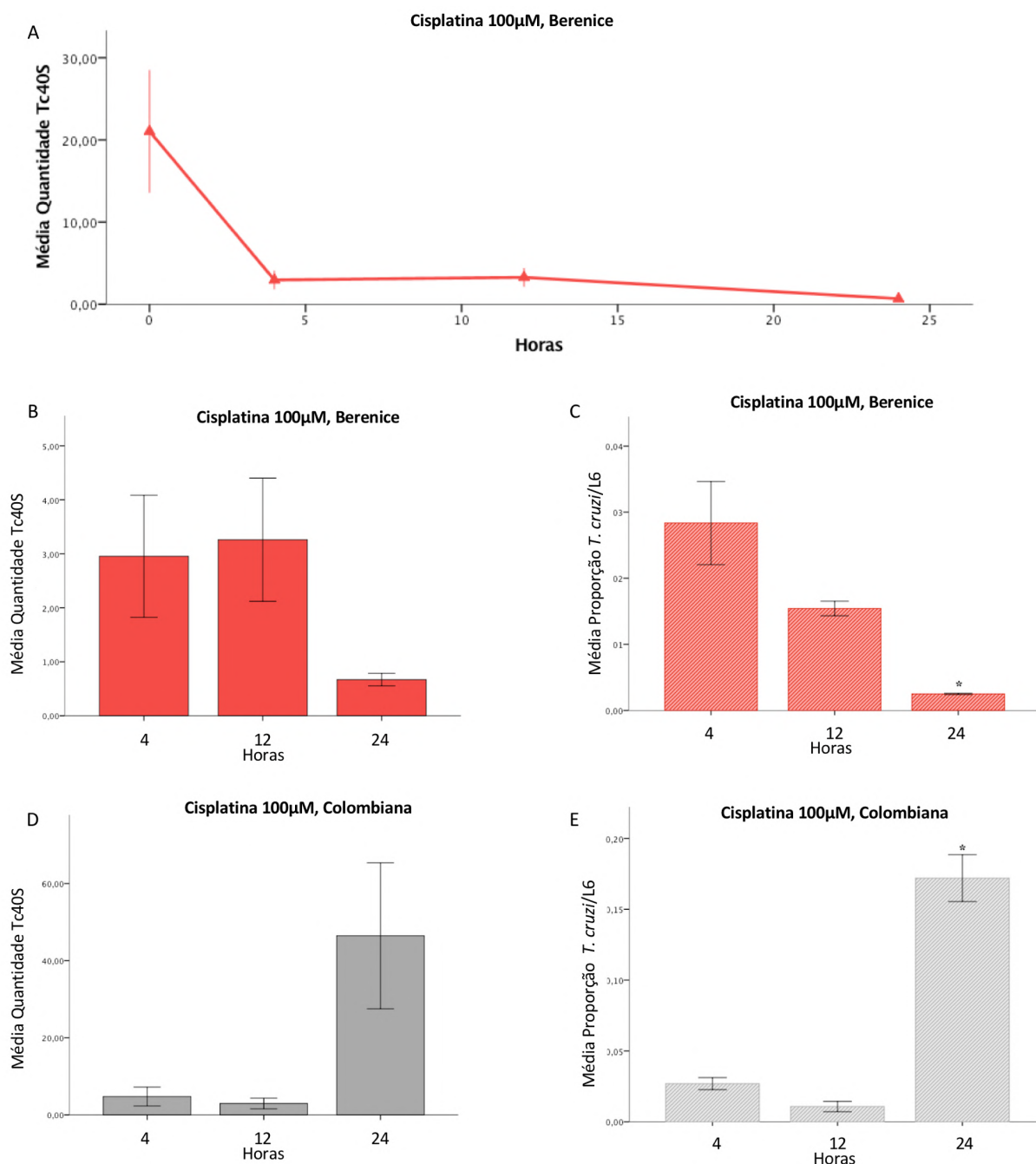


Figura 36. Quantidade de *Trypanosoma cruzi* em células tratadas com cisplatina 100µM, a partir da quantificação de *Tc40S*. A) Quantidade de parasitos da cepa Berenice em células infectadas, no tratamento com cisplatina 100µM, ao longo do tempo. B) Quantidade de parasitos da cepa Berenice em células infectadas, durante tratamento com cisplatina 100µM e recuperação. C) Quantidade relativa de parasitos da cepa Berenice, considerando a quantidade de células L6, avaliadas ao longo do tempo do tratamento com cisplatina 100µM. D) Quantidade de parasitos da cepa Colombiana em células infectadas, durante tratamento com cisplatina 100µM e recuperação. E) Quantidade relativa de parasitos da cepa Colombiana, considerando a quantidade de células L6, avaliadas ao longo do tempo do tratamento com cisplatina 100µM.

3.3.3 Efeito da cisplatina na expressão de genes de reparo do *Trypanosoma cruzi*

O tratamento com cisplatina 25µM aumentou a expressão de *TcPCNA* ($p < 0,05$) da cepa Berenice, nas primeiras 4h de tratamento (Figura 37A). O mesmo foi observado no tratamento com cisplatina 100µM (dado não mostrado). Este gene manteve a expressão aumentada até o final do tratamento (12h), e nas 24h após o início do tratamento voltou aos níveis basais de expressão. *TcMSH2* apenas apresentou variação significativa apenas no tratamento de 100µM, também com aumento de expressão às 4h do tratamento ($p < 0,05$), e normalização da expressão nas horas seguintes (Figura 37C).

Quanto à cepa Colombiana, interessante, o tratamento com cisplatina 25µM levou a uma redução da expressão de *TcPCNA* ($p < 0,05$), apenas no período de recuperação (24h) (Figura 37B). O tratamento com cisplatina 100µM não levou a nenhuma alteração significativa na expressão de *TcPCNA* nesta cepa (dado não mostrado). Interessante, só houve aumento na expressão de *TcMSH2* ($p < 0,05$) no tratamento mais intenso, 100µM, e apenas durante o período de recuperação (24h). Nas horas durante o tratamento (4h e 12h) a expressão de *TcMSH2* manteve-se semelhante aos níveis basais (Figura 37D).

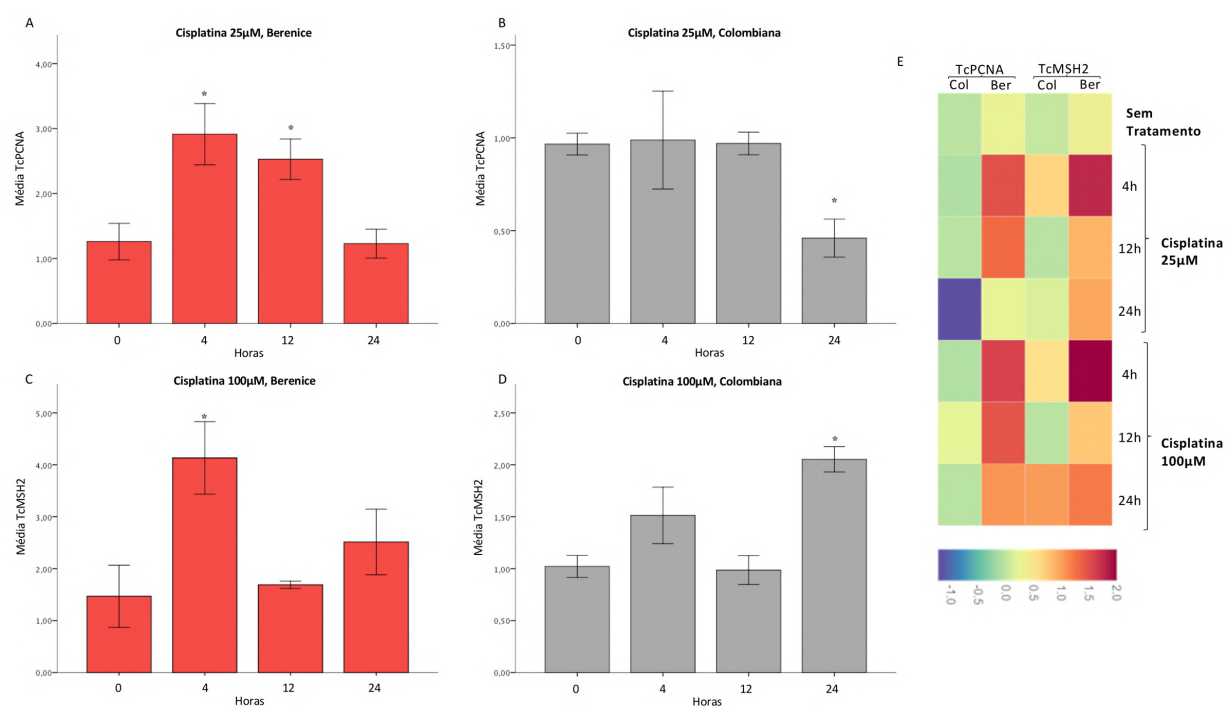


Figura 37. Expressão de genes de reparo de *Trypanosoma cruzi* no tratamento com cisplatina. A) Expressão de *TcPCNA* da cepa Berenice no tratamento com cisplatina 25µM. B) Expressão de *TcPCNA* da cepa Colombiana no tratamento com cisplatina 25µM. C) Expressão de *TcMSH2* da cepa Berenice no tratamento com cisplatina 100µM. D) Expressão de *TcMSH2* da cepa Colombiana no tratamento com cisplatina 100µM. E) Heatmap de expressão de *TcPCNA* e *TcMSH2* no tratamento com cisplatina. * $p < 0,05$.

4 Influência da infecção após tratamento com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

4.1 Efeito do Peróxido de Hidrogênio na viabilidade de células L6

Inicialmente, as células L6 foram expostas a diferentes doses de H₂O₂ (0 a 1,6mM) por 4h. Foi feita a avaliação da mortalidade (sub-G1) imediatamente após o dano (4h), às 12h após o início do tratamento e as 24h após o início do tratamento. De interesse, a variação na concentração de H₂O₂ tem efeito na mortalidade apenas no tempo de 24h (Figura 38). Nos tempos de 4 e 12h a regressão não mostrou relação entre concentração e mortalidade, enquanto no tempo de 24h essa relação é positiva ($R^2=0,837$; $p<0,001$). Para continuação das análises foram escolhidas concentrações que causam baixa mortalidade (cerca de 10% de mortalidade; 0,8mM) e que causam uma mortalidade moderada (cerca de 30% de mortalidade; 1,6mM). O tempo de recuperação também se mostrou importante na influência da concentração do composto na degradação de DNA, onde a regressão é positiva para concentrações entre 0 e 0,8mM ($p<0,001$), às 12h ($R^2=0,801$, $p<0,01$) e 24h ($R^2=0,626$, $p<0,05$).

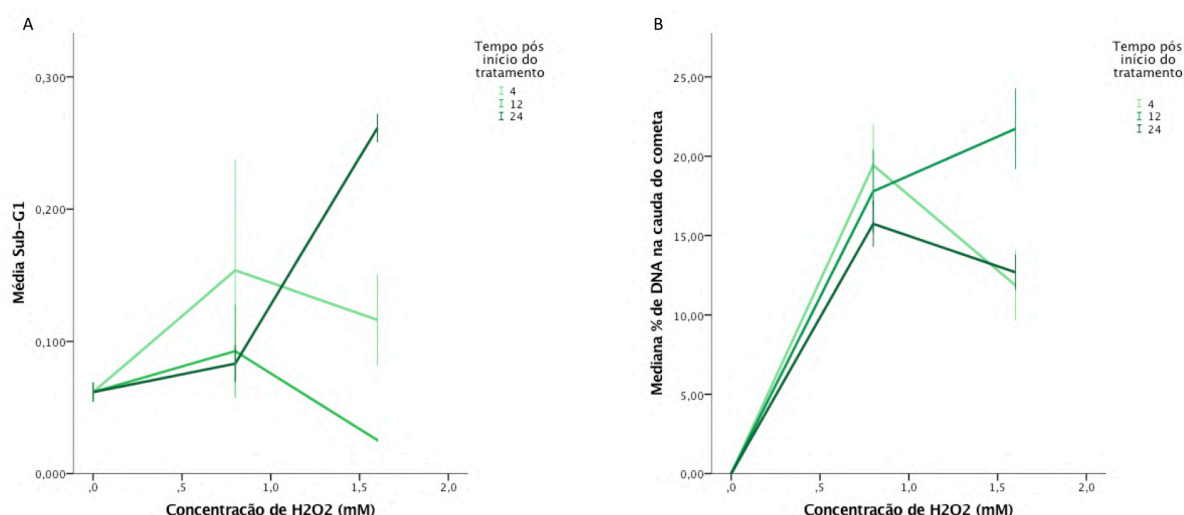


Figura 38. Efeito da concentração de Peróxido de Hidrogênio em células L6. A) Efeito da concentração na mortalidade (sub-G1). B) Efeito da concentração na degradação de DNA.

Imediatamente após o tratamento (4h), o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio também aumentou a expressão de *Msh2* ($p<0,05$), *P21* ($p<0,001$), *P53* ($p<0,001$) *Pcna* ($p<0,001$) e *Rad51* ($p<0,05$), indicando ativação das vias de reparo MMR e, possivelmente HR. Nas células L6 analisadas às 12h e 24h nenhum gene foi alterado pelo aumento da concentração.

4.2 Efeito da infecção com tratamento do Peróxido de Hidrogênio

4.2.1 Efeito na Mortalidade

A infecção com *T. cruzi* não alterou a mortalidade (sub-G1) das células imediatamente após o tratamento (4h) (Figura 39A). Às 12h após o início do tratamento, ou seja, com 8h de recuperação, células infectadas com *T. cruzi* apresentam maior mortalidade (Figura 39B), e existe relação positiva entre o aumento da concentração e sub-G1 ($p < 0,001$) – regressão linear para Berenice ($R^2 = 0,693$, $p < 0,01$); regressão linear para Colombiana ($R^2 = 0,629$, $p < 0,05$).

Após 24h do tratamento, em todos os grupos existe uma relação positiva entre o aumento da concentração e aumento da mortalidade ($p < 0,001$), no entanto, células infectadas com a cepa Colombiana apresentaram uma mortalidade significativamente menor que células não infectadas ($p < 0,01$) e infectadas com *T. cruzi* Berenice ($p < 0,001$) (Figura 39C).

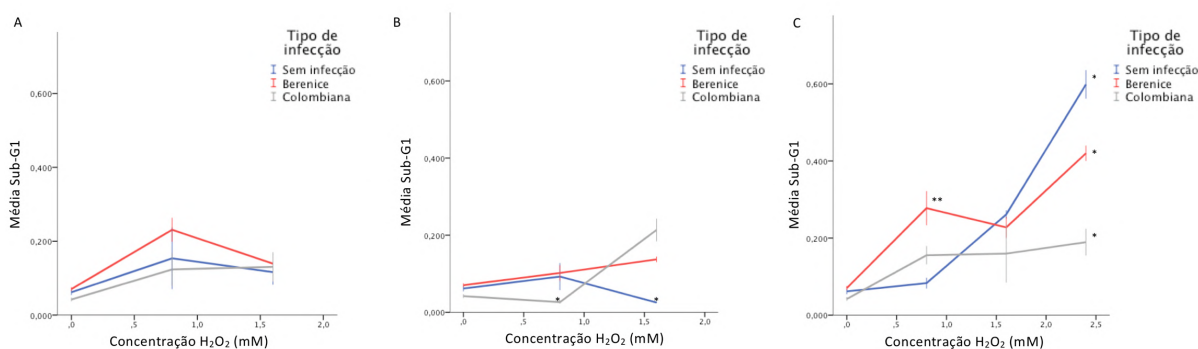


Figura 39. Influência da concentração de Peróxido de Hidrogênio (mM) na mortalidade (Sub-G1) de células L6 infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*. A) Mortalidade avaliada imediatamente após o fim do tratamento (4h). B) A mortalidade foi avaliada 12h após o início do tratamento. A infecção por *T. cruzi* aumentou a mortalidade das células L6. C) Mortalidade avaliada 24h após o tratamento. Observa-se aumento de mortalidade nos três grupos, porém de maneira menos acentuada em células L6 infectadas com a cepa Colombiana ($p < 0,01$). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

Ao se avaliar a mortalidade (sub-G1) ao longo do tempo, em células tratadas com peróxido de hidrogênio na concentração de 0,8mM, percebe-se que a curva de mortalidade apresenta uma relação linear para células infectadas com *T. cruzi* ($p < 0,05$), o que não é verificado para as culturas não infectadas (Figura 40A). Células infectadas com a cepa Berenice apresentam mortalidade significativamente superior aos demais grupos ($p < 0,01$), ficando mais evidente no ponto de 24h pós início do tratamento (Figura 40B).

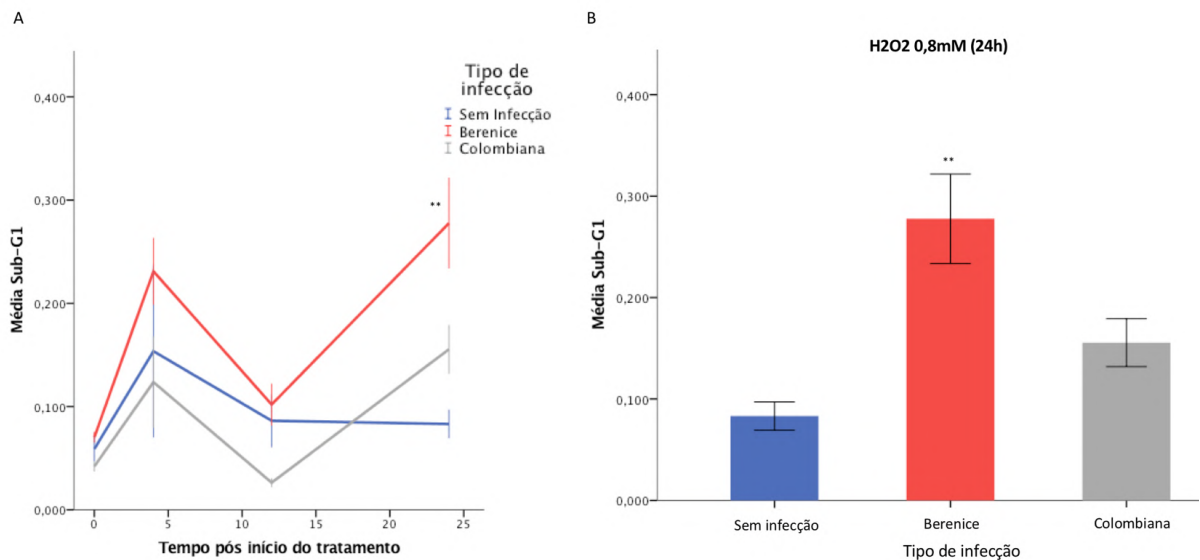


Figura 40. Mortalidade de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com H₂O₂ 0,8mM. A) Taxa de mortalidade (sub-G1) em relação ao tempo pós início do tratamento (em horas). Células infectadas com *T. cruzi* Berenice morrem significativamente mais que os demais grupos ($p < 0,01$). B) Proporção de células mortas (sub-G1) a 24h após o tratamento com H₂O₂ 0,8mM. ** $p < 0,01$.

O tratamento com H₂O₂ a 1,6mM levou a uma mortalidade crescente ao longo do tempo (Figura 41A), influenciada pelo tipo de infecção ($p < 0,01$), onde a cepa Colombiana mostrou afetar mais a sobrevivência das células L6 do que a cepa Berenice. Merece a atenção o tempo de 12h pós início do tratamento (4h de tratamento + 8h de recuperação) (Figura 41B), que apresenta redução significativa da mortalidade em células não infectadas ($p < 0,05$). Nos demais pontos, não há diferença significativa entre os tipos de infecção. Curiosamente, enquanto a mortalidade de células sem infecção e infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentam relação linear, segundo regressão ($R^2 = 0,488$, $p < 0,05$; $R^2 = 0,730$, $p < 0,001$, respectivamente), células infectadas com *T. cruzi* Colombiana não apresentam significância na regressão linear da mortalidade ao longo do tempo.

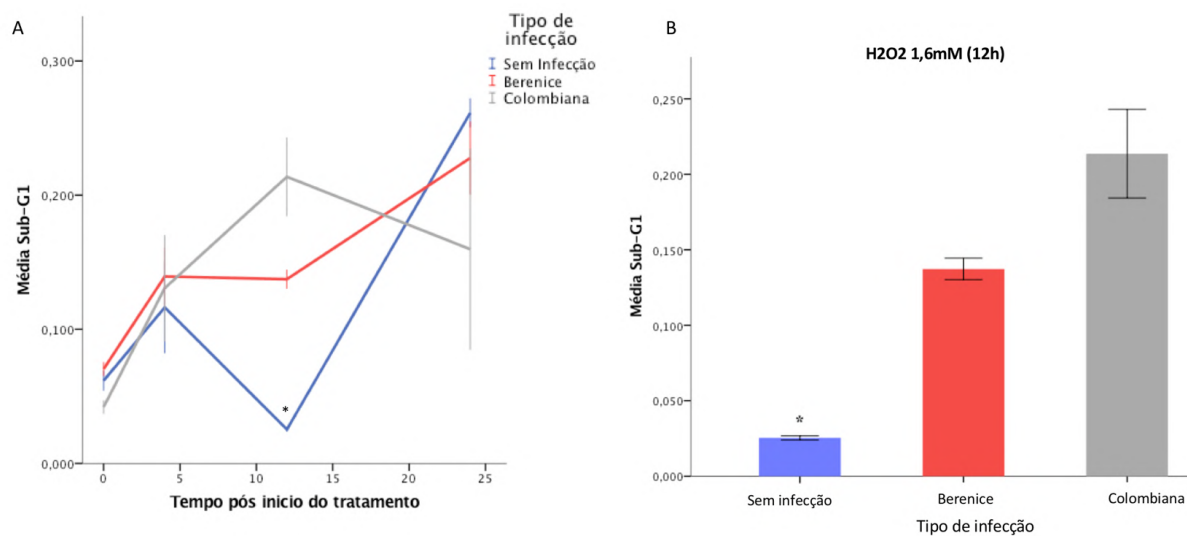


Figura 41. Mortalidade de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, e tratadas com H₂O₂ 1,6mM. A) Taxa de mortalidade (sub-G1) em relação ao tempo pós início do tratamento (em horas). B) Proporção de células mortas (sub-G1) 12h após tratamento com H₂O₂ 1,6mM. *p<0,05.

4.2.2 Classificação da Morte Celular

O teste de anexina/PI, específico para indicar o tipo de morte celular, mostrou que o aumento da concentração de H₂O₂ influencia no aumento de necrose, apoptose e apoptose tardia, sendo este último maior em células infectadas por *T. cruzi* (p<0,05) (Figura 42).

No tratamento com H₂O₂ 0,8mM, a maior parte da mortalidade se deu por apoptose, e células infectadas por Colombiana morreram significativamente menos por necrose que em outros grupos (p<0,05) (Figura 42C).

No tratamento com H₂O₂ 1,6mM, não foram encontradas diferenças significativas de apoptose ou necrose entre os grupos.

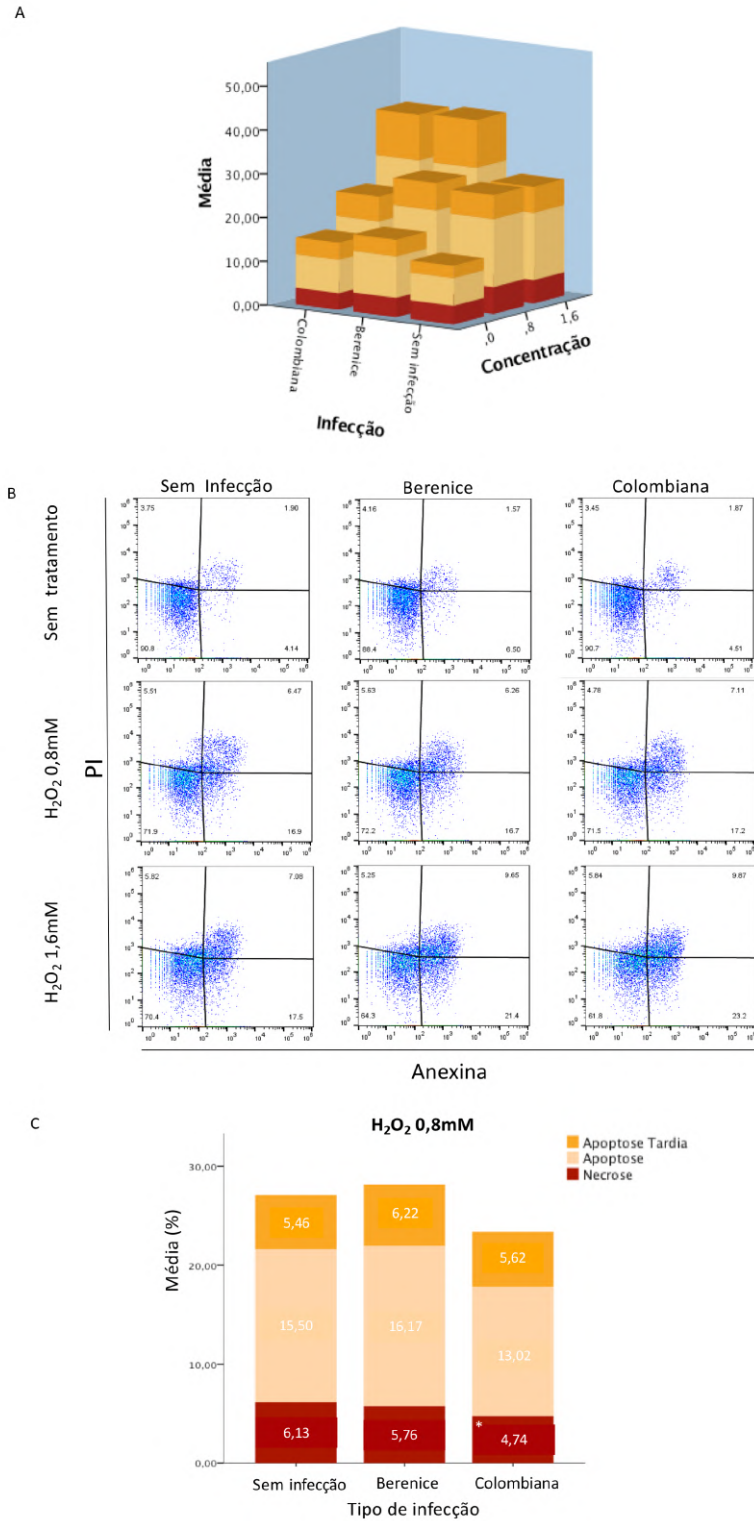


Figura 42. Tipo de morte celular de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, após tratamento com Peróxido de Hidrogênio. A) Gráfico tridimensional apresentando os tipos de mortalidade (apoptose, apoptose tardia e necrose) conforme o aumento da concentração e tipo de infecção. Note que há uma tendência de aumento da mortalidade com o aumento da concentração. B) *Dotblot* da citometria mostrando células vivas (Anexina- e PI-), em necrose (Anexina- e PI+), entrando em apoptose (Anexina+ e PI-) e em apoptose tardia (Anexina+ e PI+). C) Porcentagem de células em necrose, apoptose e apoptose tardia após 24h do tratamento com H₂O₂ 0,8mM. A morte por necrose mostrou-se significativamente menor em células infectadas com Colombiana ($p < 0,05$). * $p < 0,05$.

4.2.3 Efeito na Degradação de DNA

A concentração de H_2O_2 tem uma relação positiva com o aumento de degradação de DNA nos tempos 4h, 12h e 24h ($p < 0,001$). No tempo 4h, células infectadas pela cepa Colombiana apresentam significativamente menos degradação que células sem infecção ($p < 0,01$) (Figura 43). Às 12h e 24h, não há diferenças entre os grupos.

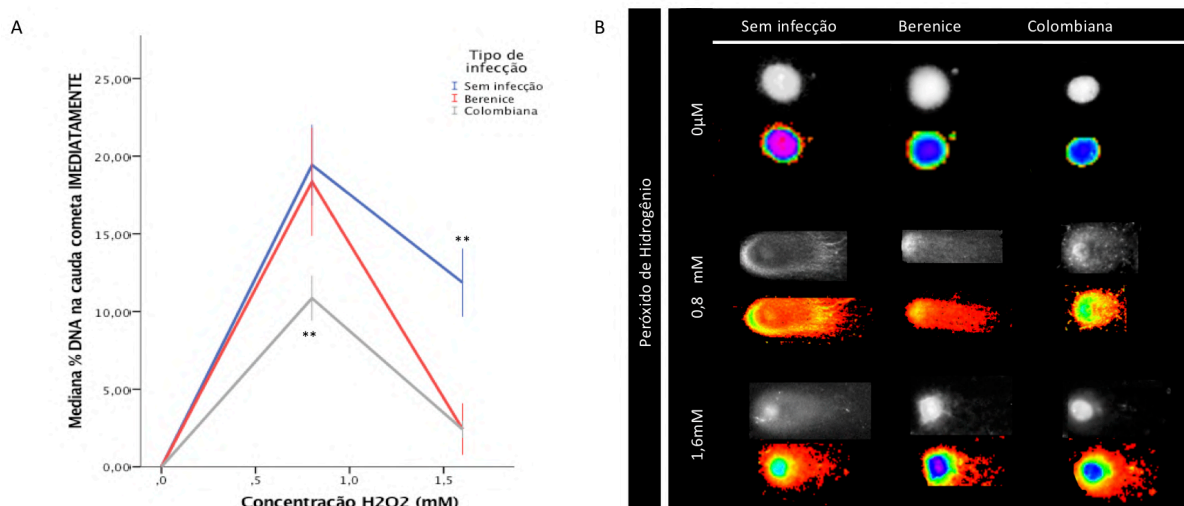


Figura 43. Degradação de DNA em células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, e tratadas com Peróxido de Hidrogênio. A) Mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa em relação à concentração de H_2O_2 , imediatamente após tratamento (tempo 4h). Note que células infectadas com a cepa Colombiana têm significativamente menos degradação que células sem infecção. B) Cometa representativo de cada valor da mediana em diferentes concentrações de H_2O_2 (0mM, 0,8mM e 1,6mM), imediatamente após tratamento, apresentado pela foto em escala de cinza e por cores de acordo com a intensidade.

Imediatamente após o fim do tratamento com H_2O_2 0,8mM (4h) já se encontra significativa degradação de DNA pelo teste do cometa ($p < 0,001$), e o nível de degradação se mantém nas horas seguintes (Figura 44A). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos infectados e não infectados nos tempos de recuperação (12h e 24h).

O tratamento com peróxido de hidrogênio 1,6mM levou a um aumento na degradação de DNA até as 12h pós início do tratamento, com uma aparente recuperação parcial no tempo de 24h (Figura 44B). Existe influência significativa do tipo de infecção e tempo de recuperação no aumento da degradação de DNA ($F=4,173$, $p < 0,01$). Logo após o fim do tratamento, ou seja, às 4h, células infectadas apresentam significativamente menos degradação de DNA que células sem infecção ($p < 0,01$) (Figura 44C). Nos demais tempos não há diferença na degradação de DNA entre os grupos.

O teste do cometa neutro em células tratadas com 1,6mM de peróxido de hidrogênio e avaliadas 24h após o início do tratamento indicou que células infectadas pela cepa Colombiana apresentaram significativamente menor quantidade de DSB que células não infectadas ($p<0,05$). A comparação dos resultados do cometa neutro com o alcalino indicou que boa parte da degradação de DNA encontrada nas culturas sem infecção e infectadas com Berenice é DSB, enquanto em Colombiana boa parte da degradação é quebra de simples fita (Figura 44D).

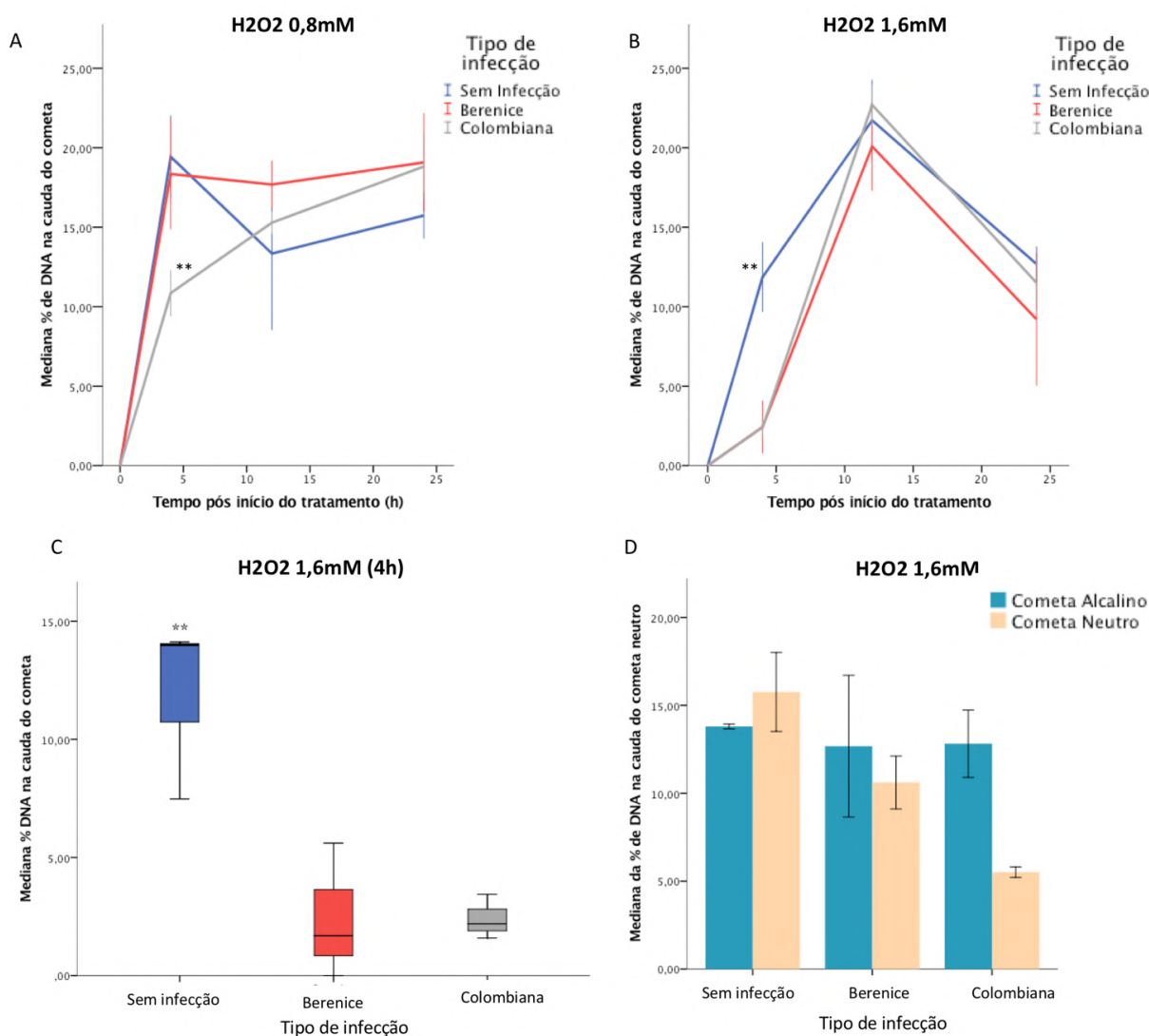


Figura 44. Degradação de DNA em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Peróxido de Hidrogênio a 0,8mM ou a 1,6mM. A) Mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa de células tratadas com H₂O₂ 0,8mM, de acordo com o tempo após o início do tratamento (em horas). B) Mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa de células tratadas com H₂O₂ 1,6mM, de acordo com o tempo após o início do tratamento (tempo em horas). C) *Box plot* da mediana da porcentagem (%) de DNA na cauda do cometa imediatamente após o tratamento com H₂O₂ 1,6mM (4h). D) Comparação da degradação de DNA encontrada no cometa alcalino (azul) e neutro (laranja), indicando DSB, nos três grupos tratados com H₂O₂ 1,6mM, 24h após tratamento. ** $p<0,01$

4.2.4 Efeito na Proliferação Celular

O tratamento com H_2O_2 levou a uma redução significativa no número de colônias. A menor quantidade de células apresenta relação linear com a concentração de peróxido de hidrogênio, nos três grupos: para sem infecção ($R^2 = 0,694$, $p < 0,01$); células infectadas com *T. cruzi* Berenice ($R^2 = 0,705$, $p < 0,01$); e com a cepa Colombiana ($R^2 = 0,677$, $p < 0,01$) (Figura 45A e B). A média do diâmetro de Feret aumenta juntamente com a concentração de H_2O_2 , mas não há diferenças entre os grupos infectados e não infectados (Figura 45C). As células passaram a apresentar um aspecto alargado e achatado, com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 45D).

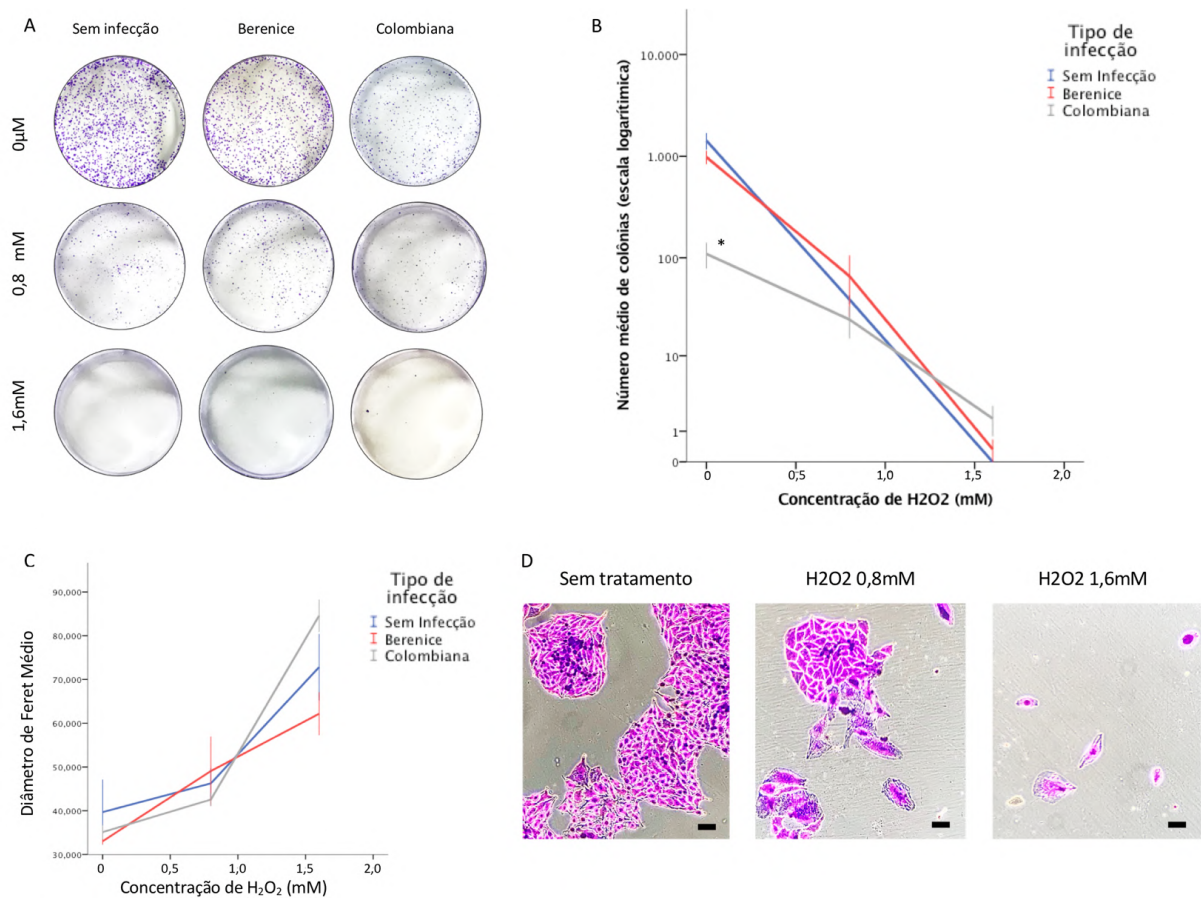


Figura 45. Proliferação celular em grupos tratados com peróxido de hidrogênio, infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*. A) Foto dos poços do ensaio de proliferação, corados com cristal violeta. B) Número médio de colônias em relação à concentração de H_2O_2 . C) Média do diâmetro de Feret em relação à concentração de H_2O_2 . D) Micrografia óptica do grupo não infectado sem tratamento e com tratamento de H_2O_2 0,8mM e 1,6mM. A barra de escala corresponde a 100 μ m.

Imediatamente após o tratamento, a proporção de células na fase G1 aumenta junto com a concentração ($p < 0,05$). A infecção interfere no comportamento do ciclo celular nas 12h ($p < 0,01$) e 24h ($p < 0,05$). Em células não infectadas, nas 12h após o início do tratamento, o aumento da concentração de H_2O_2 provoca uma redução inicial na proporção de células na fase G1 ($p < 0,01$), e, conforme aumenta a concentração, a proporção de células na fase G1 também aumenta ($p < 0,01$). Em células infectadas com *T. cruzi* Berenice, existe uma redução na proporção de células na fase G1 conforme aumenta a concentração de H_2O_2 , sendo significativa a 0,8mM ($p < 0,05$). Em células infectadas com a cepa Colombiana, a concentração de peróxido de hidrogênio não exerce influência no ciclo celular 12h depois do tratamento (Figura 46A). Às 24h após o tratamento, a concentração não afetou no ciclo de celular de células não infectadas nem de células infectadas por Berenice, mas em células infectadas com Colombiana há uma redução significativa na proporção de células na fase G1 ($p < 0,05$) (Figura 46B).

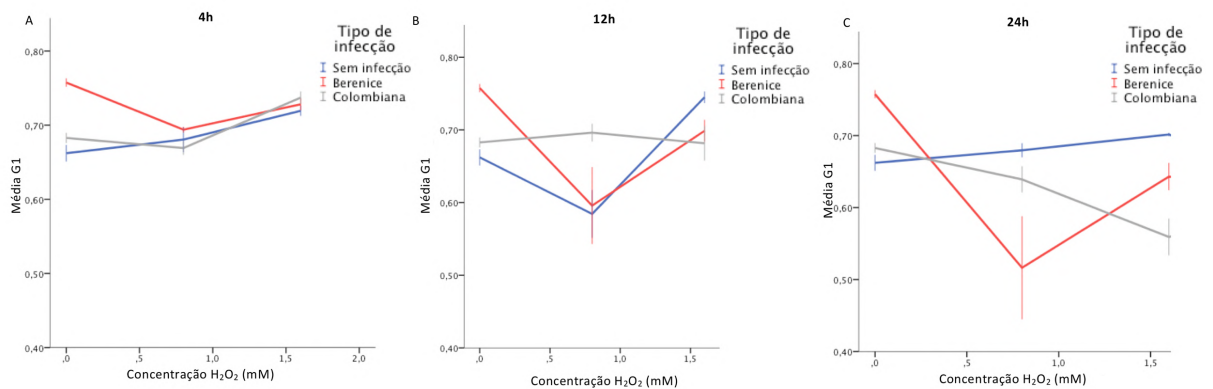


Figura 46. Ciclo celular de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, e tratadas com peróxido de hidrogênio. A) Quantidade de células na fase G1 em relação ao aumento da concentração de H_2O_2 , 4h após início do tratamento. B) Quantidade de células na fase G1 em relação ao aumento da concentração de H_2O_2 , 12h após início do tratamento. C) Quantidade de células na fase G1 em relação ao aumento da concentração de H_2O_2 , 24h após início do tratamento. * $p < 0,05$

No tratamento com H_2O_2 0,8mM, apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos, células infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentaram uma redução linear na proporção de células em fase G1 (Figura 47) ao longo do tempo pós tratamento ($R^2=0,436$, $p < 0,01$). Essa relação linear não foi encontrada em células não infectadas ou infectadas com *T. cruzi* Colombiana.

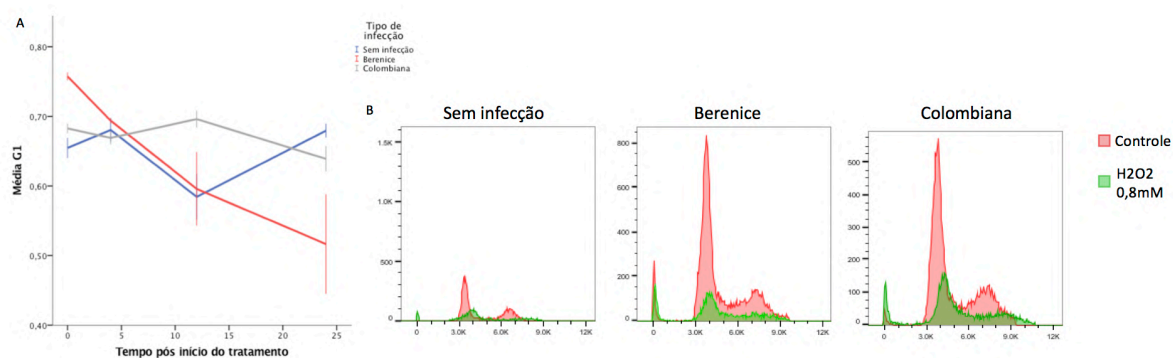


Figura 47. Ciclo celular de células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, após tratamento com H₂O₂ 0,8mM. A) Porcentagem de células em fase G1 e S/G2 imediatamente após tratamento com peróxido de hidrogênio. B) Histograma de fluorescência de iodeto de propídeo mostrando ciclo celular antes (vermelho) e após (verde) tratamento com H₂O₂ 0,8mM, 24h após início do tratamento.

Já no tratamento com 1,6mM de H₂O₂, quando avaliadas 24h após início do tratamento, células infectadas com *T. cruzi* Colombiana apresentam significativamente mais células na fase S/G2 que células sem infecção ($p < 0,01$) e infectadas com Berenice ($p < 0,05$) (Figura 48A e C). Ao se analisar a proporção de células na fase G1 em relação ao tempo pós tratamento, percebe-se que células infectadas com *T. cruzi* apresentam uma relação linear de redução de células na fase G1 (ou seja, aumento de células na fase S/G2) ao longo do tempo (Berenice $R^2 = 0,832$, $p < 0,001$; Colombiana $R^2 = 0,642$, $p < 0,05$). Em células não infectadas, não foi encontrada relação linear na proporção de células na fase G1 ao longo do tempo (Figura 48B). Nota-se que, ainda assim, em nenhuma situação houve um número maior de células em fase S/G2 em relação ao número na fase G1, ou seja $G1 > 0,5$.

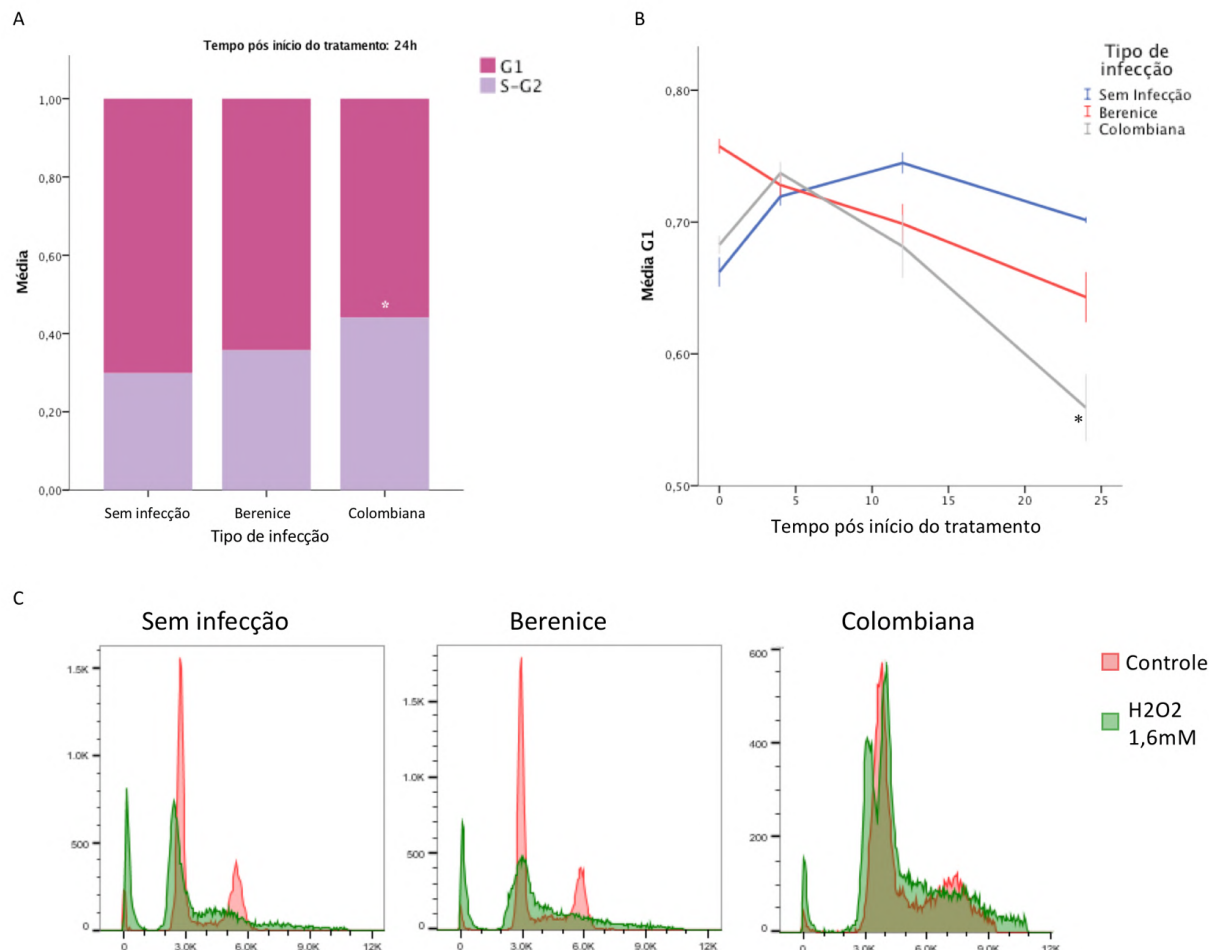


Figura 48. Ciclo celular de culturas L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, após tratamento com H_2O_2 1,6mM. A) Porcentagem de células em fase G1 e S/G2 imediatamente após tratamento com peróxido de hidrogênio. B) Proporção média de células em fase G1 em comparação com o tempo após início do tratamento de peróxido de hidrogênio. C) Histograma de fluorescência de iodeto de propídeo mostrando ciclo celular antes (vermelho) e após (verde) tratamento com H_2O_2 1,6mM. * $p < 0,05$

4.2.5 Efeito na expressão gênica

4.2.5.1 Expressão de genes relacionados à mortalidade celular

A análise da expressão do gene anti apoptótico *Bcl2* no tratamento com H_2O_2 0,8mM indicou que há redução nos níveis deste gene em todos os grupos com o passar do tempo ($p < 0,01$), mas não há diferença na expressão de células infectadas e não infectadas. No tratamento com H_2O_2 1,6mM, não há alteração na expressão de *Bcl2* em células sem infecção e infectadas pela cepa Colombiana, em nenhum momento. Em células infectadas com *T. cruzi* Berenice, há expressão reduzida de *Bcl2* ($p < 0,01$) apenas em células avaliadas após o período de recuperação (24h).

A concentração de peróxido de hidrogênio aumenta a expressão de *P53* imediatamente após o tratamento (4h) em células L6 sem infecção ($p < 0,01$) e em células infectadas com *T.*

cruzi ($p < 0,001$), sendo que a expressão é menor em células com Berenice ($p < 0,05$). É interessante observar que a expressão de *P53* é maior no tratamento com 0,8mM de H_2O_2 que no tratamento mais intenso de 1,6mM ($p < 0,001$) (Figura 49B). No tratamento 1,6mM, apenas células infectadas com Berenice apresentam aumento na expressão de *P53*, nos demais grupos não há influência do tratamento na expressão desse gene. Nos tempos de recuperação do tratamento (12h e 24h), também apenas células infectadas pela cepa Berenice apresentam aumento significativo na expressão de *p53* ($p < 0,01$). O *heatmap* da expressão de *Bcl2* e *P53* está apresentado na Figura 49A.

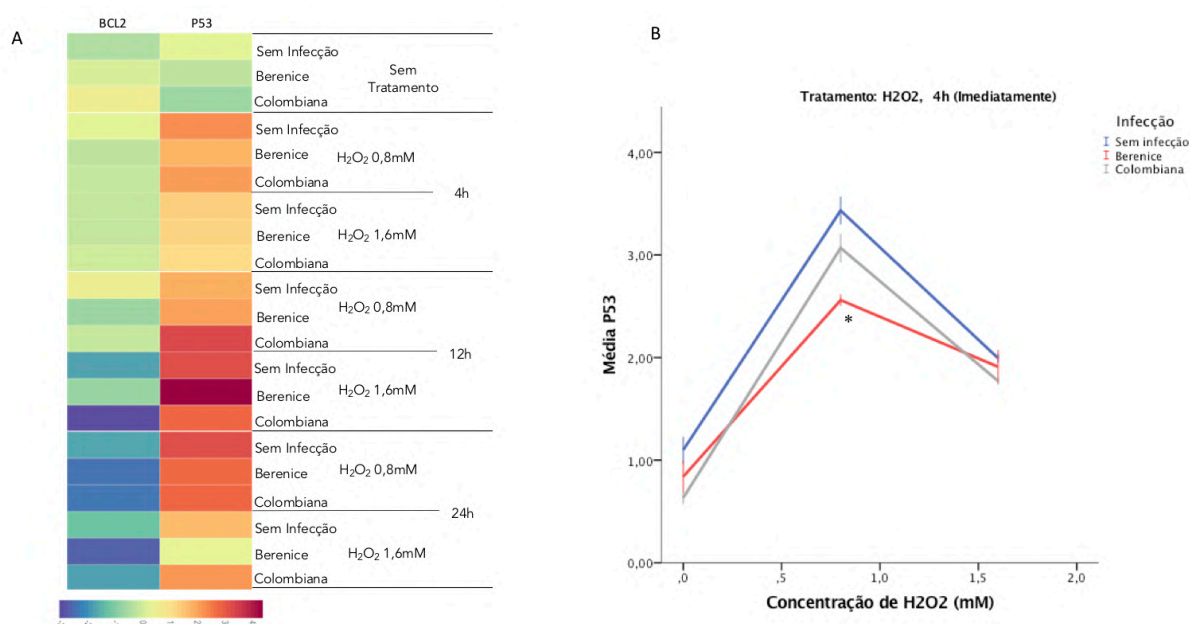


Figura 49. Expressão de *Bcl2* e *P53* em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Peróxido de Hidrogênio. A) *Heatmap* do resultado da RT-qPCR apontando maior (vermelho) ou menor (azul) expressão de *Bcl2* e *P53* em comparação com calibrador (controle não infectado e não tratado). B) Gráfico da expressão de *P53* em comparação com aumento da concentração de cisplatina, imediatamente após tratamento com H_2O_2 (4h). * $p < 0,05$

4.2.5.2 Expressão de genes envolvidos no reparo de DNA

A Figura 50 apresenta o *heatmap* dos genes estudados envolvidos no reparo de DNA em resposta ao tratamento com H_2O_2 . O tratamento com peróxido de hidrogênio leva a um aumento na expressão de *Rad51*, imediatamente após o tratamento (4h), nos três grupos, apenas na concentração de 0,8mM. Neste período, células infectadas por *T. cruzi* Berenice expressam este gene significativamente menos que células não infectadas ($p < 0,01$). Os níveis de *Rad51* se mantêm aumentados nas horas seguintes, e, 24h após o início do tratamento, *Rad51* retorna aos

níveis basais (Figura 51B). Na concentração de 1,6mM, é percebido alteração de *Rad51* apenas em células infectadas com a cepa Berenice.

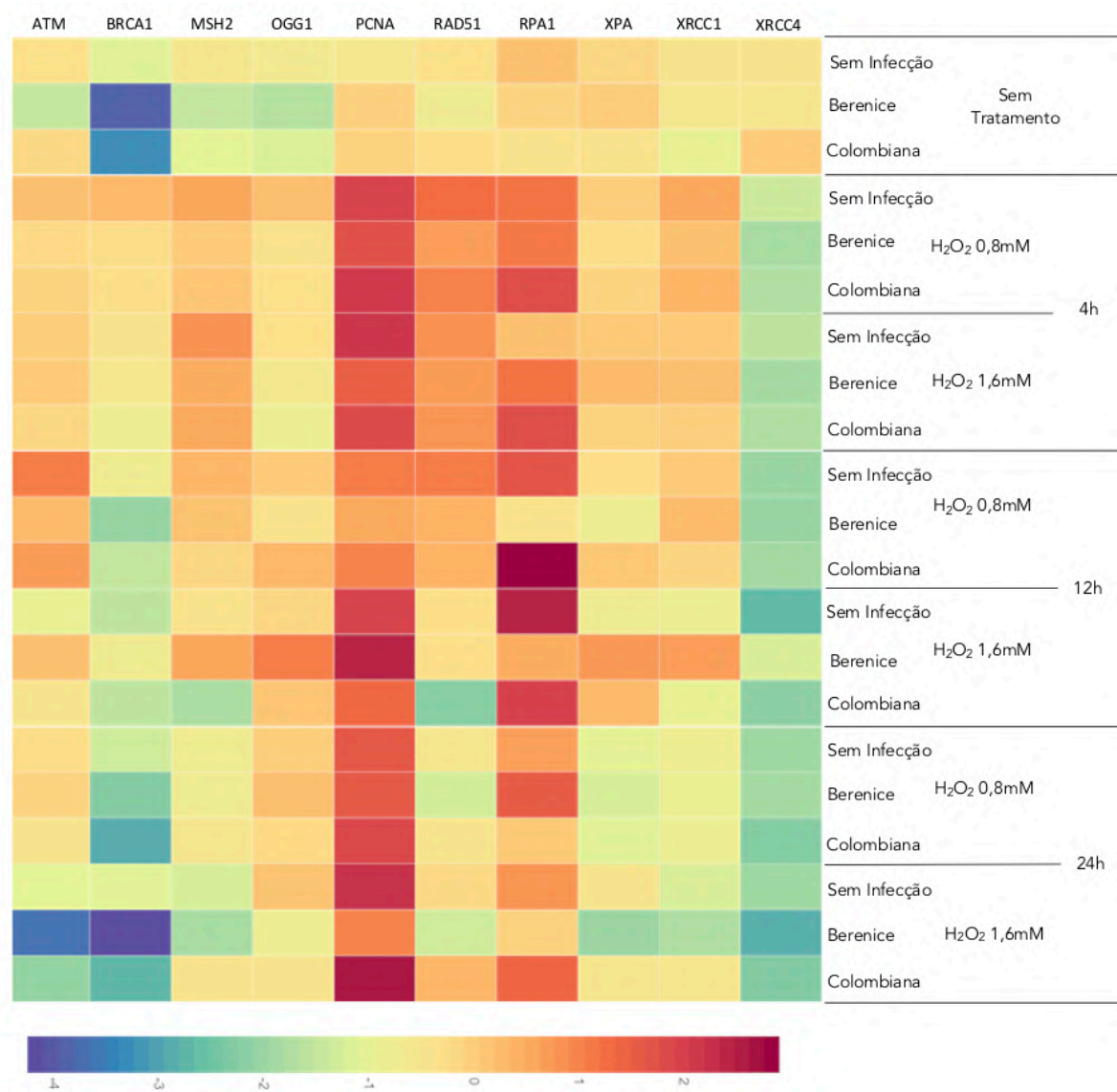


Figura 50. Expressão de genes de reparo em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Peróxido de Hidrogênio. A) *Heatmap* do resultado da RT-qPCR apontando maior (vermelho) ou menor (azul) expressão de genes de reparo em comparação com calibrador (controle não infectado e não tratado).

A expressão de *Atm* é aumentada de forma progressiva ($p < 0,05$) nas 12 primeiras horas, apenas no tratamento com H_2O_2 0,8mM. Células infectadas com *T. cruzi* Berenice expressam significativamente menos *Atm* que células sem infecção (Figura 51A), às 4h e 12h do início do tratamento. Interessantemente, células sem infecção e infectadas com a cepa Colombiana retornam aos níveis basais de *Atm*, quando avaliadas 24h após o tratamento, mas o grupo infectado por Berenice mantém expressão aumentada ($p < 0,05$). O gene *Brcal* apresenta-se

mais expresso em células não infectadas ($p < 0,05$), ao se comparar com células infectadas com *T. cruzi* (Figura 51C), imediatamente após o fim do tratamento (4h) com H_2O_2 0,8mM, e não tem alteração de expressão significativa nos períodos de recuperação.

Não há alteração significativa de *Xrcc4* nos tratamentos com H_2O_2 (Figura 51D). Interessantemente, imediatamente após o fim do tratamento com H_2O_2 0,8mM, a expressão de *Xrcc4* é relativamente maior em células não infectadas ($p < 0,01$).

Imediatamente após o tratamento (4h), há aumento de expressão de *Pcna* ($p < 0,001$) em todos os grupos, com diferença significativa entre as células infectadas pelas duas cepas de *T. cruzi*, onde células infectadas pela cepa Colombiana apresentam maior expressão ($p < 0,01$). Células infectadas pela cepa Berenice apresentam significativamente menor expressão de *Pcna* ($p < 0,01$) que células não infectadas, no tratamento com H_2O_2 1,6mM (Figura 51E). Apenas células infectadas com Berenice apresentam relação entre a concentração de peróxido de hidrogênio e os níveis de *Pcna* nos tempos de recuperação (12h e 24h; $p < 0,01$).

Há também aumento da expressão de *Msh2* em células não infectadas (às 4h) e em células infectadas com Berenice (às 4h e 12h) ($p < 0,05$), sendo que a expressão é maior em células sem infecção ($p < 0,05$) (Figura 51F). Em células infectadas com *T. cruzi* Colombiana não há alteração significativa na expressão de *Msh2* em nenhum momento durante tratamento com H_2O_2 .

Apenas no tratamento com H_2O_2 1,6 mM, em células infectadas por *T. cruzi* Colombiana, há um aumento significativo de *Rpal* imediatamente após o tratamento ($p < 0,05$) (Figura 51G). Nesta concentração, células infectadas com a cepa Berenice apresentam redução significativa na expressão de *Xpa* ($p < 0,05$) no tempo de 24h.

Às 4h pós tratamento com H_2O_2 0,8mM, células não infectadas apresentam maior expressão de *Ogg1* que células infectadas (Figura 51H). No entanto, ao longo do tempo, não há aumento significativo de *Ogg1* em células não infectadas, nem em infectadas com Colombiana. Em células infectadas pela cepa Berenice, no entanto, foi significativo o aumento na expressão de *Ogg1* ($p < 0,05$) nos períodos de recuperação (12h e 24h), nas concentrações de 1,6mM e 0,8mM, respectivamente (Figura 51H e I). Todos os grupos apresentam aumento na expressão de *Xrcc1* ($p < 0,05$) nas primeiras 4h de tratamento, e em Berenice há redução de *Xrcc1* às 24h pós tratamento (dado não mostrado).

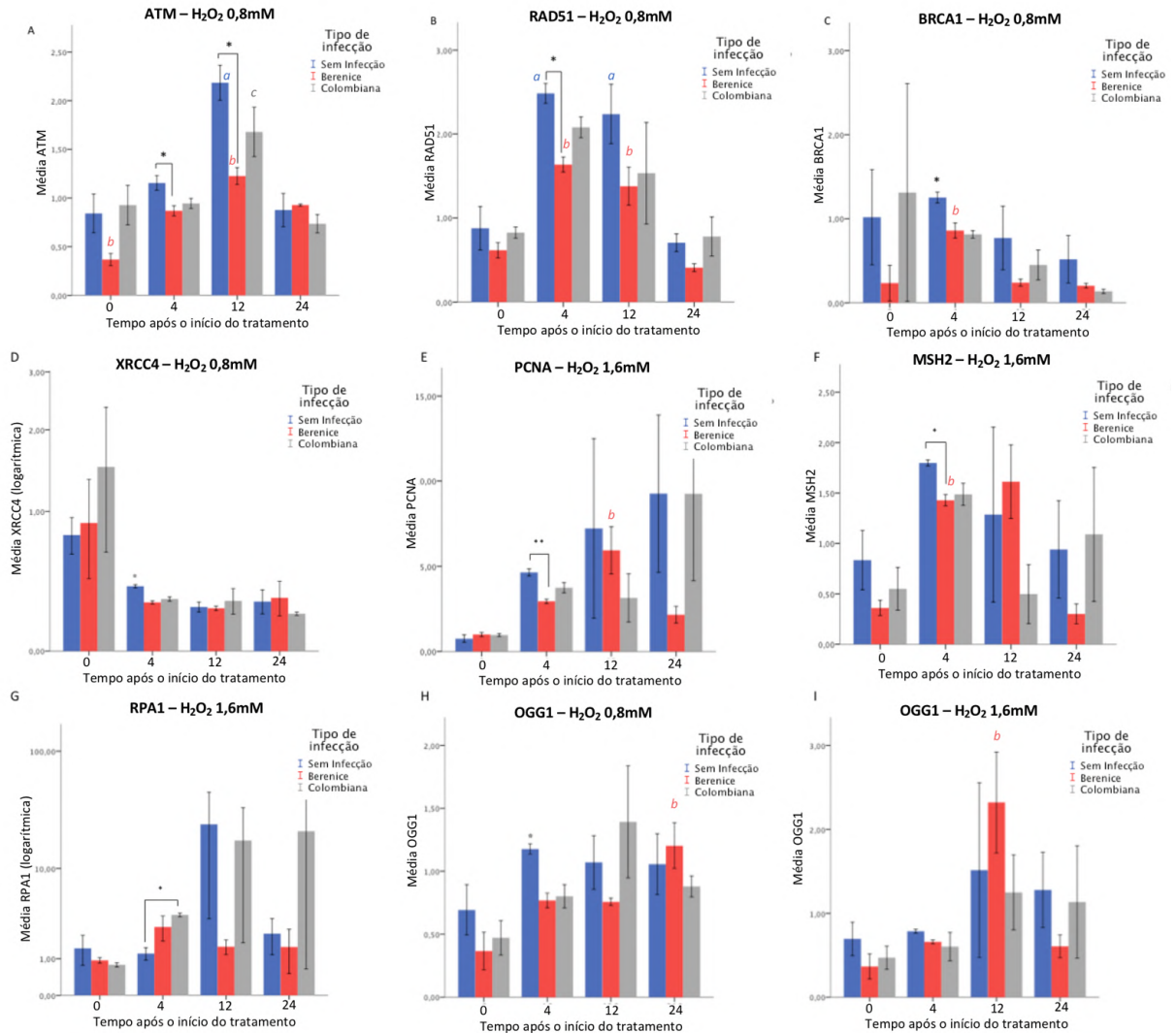


Figura 51. Expressão de genes de reparo de DNA em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Peróxido de Hidrogênio 0,8mM (A-D e H) e 1,6mM (E-G e I). Expressão de A) *Atm*; B) *Rad51*; C) *Brcal*; D) *Xrcc4*; E) *Pcna*; F) *Msh2*; G) *Rpal*; H e I) *Ogg1* em diferentes tempos após tratamento com H₂O₂ 0,8mM ou 1,6mM. Tempo representado em horas (h). *p<0,05 **p<0,01. a: estatística referente a células sem infecção (p<0,05); b: estatística referente a células infectadas com a cepa Berenice (p<0,05); c: estatística referente a células infectadas pela cepa Colombiana (p<0,05).

4.2.5.3 Expressão do retroelemento LINE-1

Não há alteração na expressão da transcriptase reversa de LINE-1 em células infectadas com *T. cruzi*, no tratamento com H₂O₂. Em células não infectadas, interessantemente, o tratamento com H₂O₂ leva à redução da expressão de ORF2 de LINE-1 às 12h, apenas na concentração de 0,8mM (dado não mostrado).

4.2.5.4 Expressão de genes relacionados com senescência e proliferação celular

A Figura 52A apresenta o *heatmap* da expressão de *P16*, *P21* e *Ki67*. Imediatamente após o tratamento com H_2O_2 , todos os grupos apresentaram aumento na expressão de *P21*, gene envolvido na regulação do ciclo celular e senescência, nas concentrações de 0,8mM e 1,6mM ($p<0,001$). Em células não infectadas, a expressão de *P21* é significativamente maior que a de células infectadas ($p<0,01$), no tratamento a 0,8mM (Figura 52B). No tratamento a 1,6mM, não há diferença significativa entre os grupos. Às 12h, apenas células infectadas pela cepa Berenice apresentam aumento significativo na expressão de *P21* ($p<0,01$). Quanto à expressão do marcador de proliferação celular *Ki67*, há redução da expressão ao longo do tempo pós tratamento, nas concentrações 0,8mM e 1,6mM, sem diferença entre grupos infectados e não infectados. Não há alteração significativa de *P16* em nenhum dos grupos tratados com H_2O_2 .

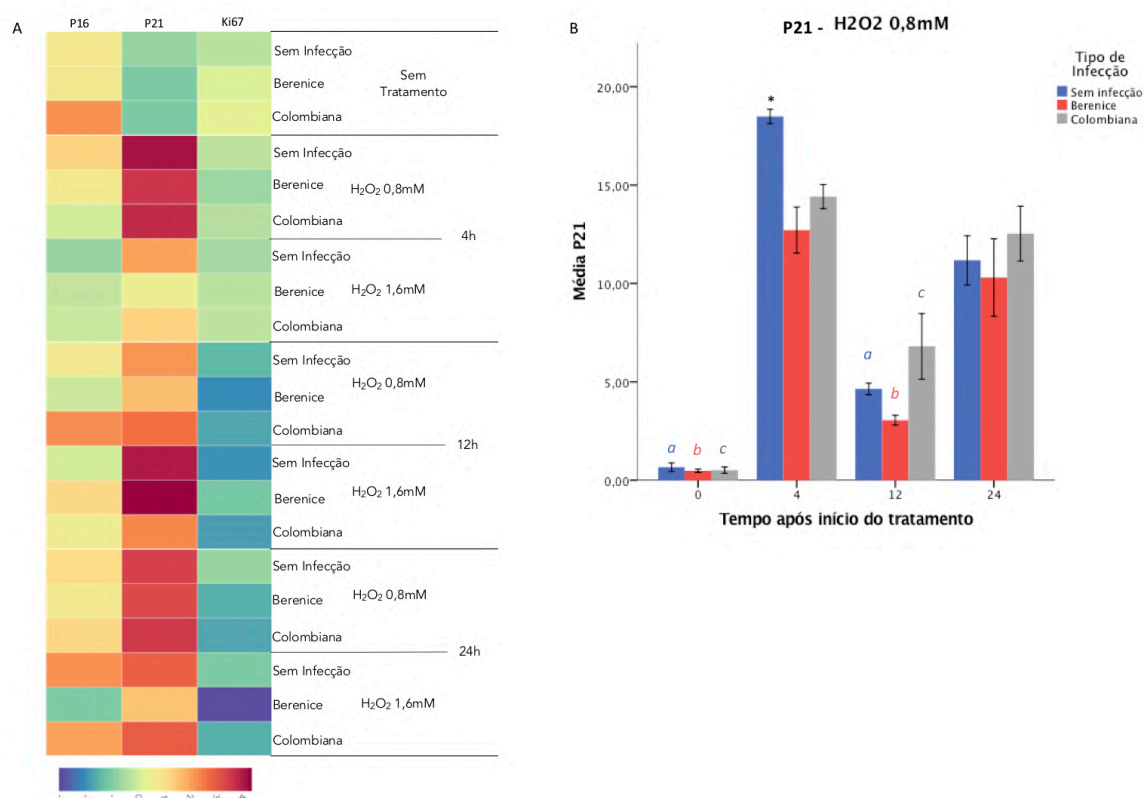


Figura 52. Expressão de *P16*, *P21* e *Ki67* em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*, tratadas com Peróxido de Hidrogênio. A) *Heatmap* do resultado da RT-qPCR apontando maior (vermelho) ou menor (azul) expressão de *P16*, *P21* e *Ki67* em comparação com calibrador. B) Expressão de *P21* em diferentes tempos após tratamento com H_2O_2 0,8mM (em horas). * $p<0,05$. a: estatística referente a células sem infecção ($p<0,05$); b: estatística referente a células infectadas com a cepa Berenice ($p<0,05$); c: estatística referente a células infectadas pela cepa Colombiana ($p<0,05$).

4.2.5.5 Testes de Correlação de Expressão Gênica

Alguns genes avaliados apresentaram correlação entre si. Interessantemente, *Rad51* apresentou correlação com *Xrcc1* no tratamento com H₂O₂ 0,8mM nos três grupos: para sem infecção (coeficiente de correlação = 0,874, p<0,001); para células infectadas com a cepa Berenice (coeficiente de correlação = 0,863, p <0,001); e para células infectadas com a cepa Colombiana (coeficiente de correlação = 0,949, p<0,001). Também houve correlação entre *Rad51* e *Atm* nos três tipos de infecção: para sem infecção (coeficiente de correlação = 0,909, p<0,001); para células infectadas com a cepa Berenice (coeficiente de correlação = 0,862, p <0,001); e para células infectadas com a cepa Colombiana (coeficiente de correlação = 0,881, p<0,001). Apenas em células sem infecção, houve correlação entre *Bcl2* e *Atm* (coeficiente de correlação =0,878, p<0,001), *Bcl2* e *Xrcc1* (coeficiente de correlação = 0,699, p<0,05) e *Bcl2* e *Rad51* (coeficiente de correlação = 0,833, p<0,01). A Figura 53 apresenta essas correlações.

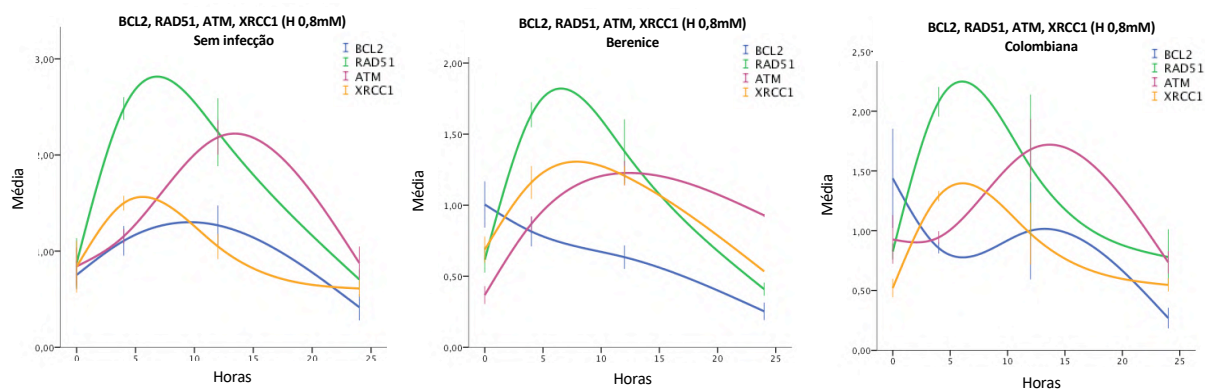


Figura 53. Correlação de expressão de *Bcl2*, *Rad51*, *Atm* e *Xrcc1* em células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, tratadas com peróxido de hidrogênio 0,8mM.

Encontrou-se também correlação entre os genes da via BER (*Ogg1* e *Xrcc1*) e NER (*Xpa*) em todos os grupos tratados com H₂O₂ 1,6mM (Figura 54). Todos obtiveram coeficiente de correlação de Pearson maior que 0,720 (p<0,01). No tratamento com H₂O₂ 0,8mM, só foi possível encontrar correlação entre *Ogg1* e *Xpa* em células infectadas. Curiosamente, o comportamento das curvas de expressão dos genes ao longo do tempo foi diferente dependendo da cepa. Em células infectadas por Berenice, percebe-se uma relação inversamente proporcional entre *Xpa* e *Ogg1* (Coeficiente de correlação: -0,784; p<0,01). Em células infectadas por Colombiana, esta a relação é positiva (Coeficiente de correlação: 0,713; p<0,01).

Células não infectadas apresentaram correlação entre o gene *Msh2*, da via MMR, e o gene *Ogg1*, da via BER, em todas as concentrações do tratamento com H₂O₂ (Coeficiente de correlação: 0,625, p<0,05) (Figura 54). Células infectadas pela cepa Colombiana apresentaram

esta correlação apenas no tratamento com H₂O₂ 0,8mM (Coeficiente de correlação: 0,659; p<0,05), e células infectadas por Berenice apenas no tratamento mais intenso de 1,6mM (Coeficiente de correlação:0,740, p<0,01). *Xrcc1*, outro gene da via BER, também apresentou correlação com *Msh2*, para os três grupos o coeficiente de correlação de Pearson foi maior que 0,780 (p<0,01).

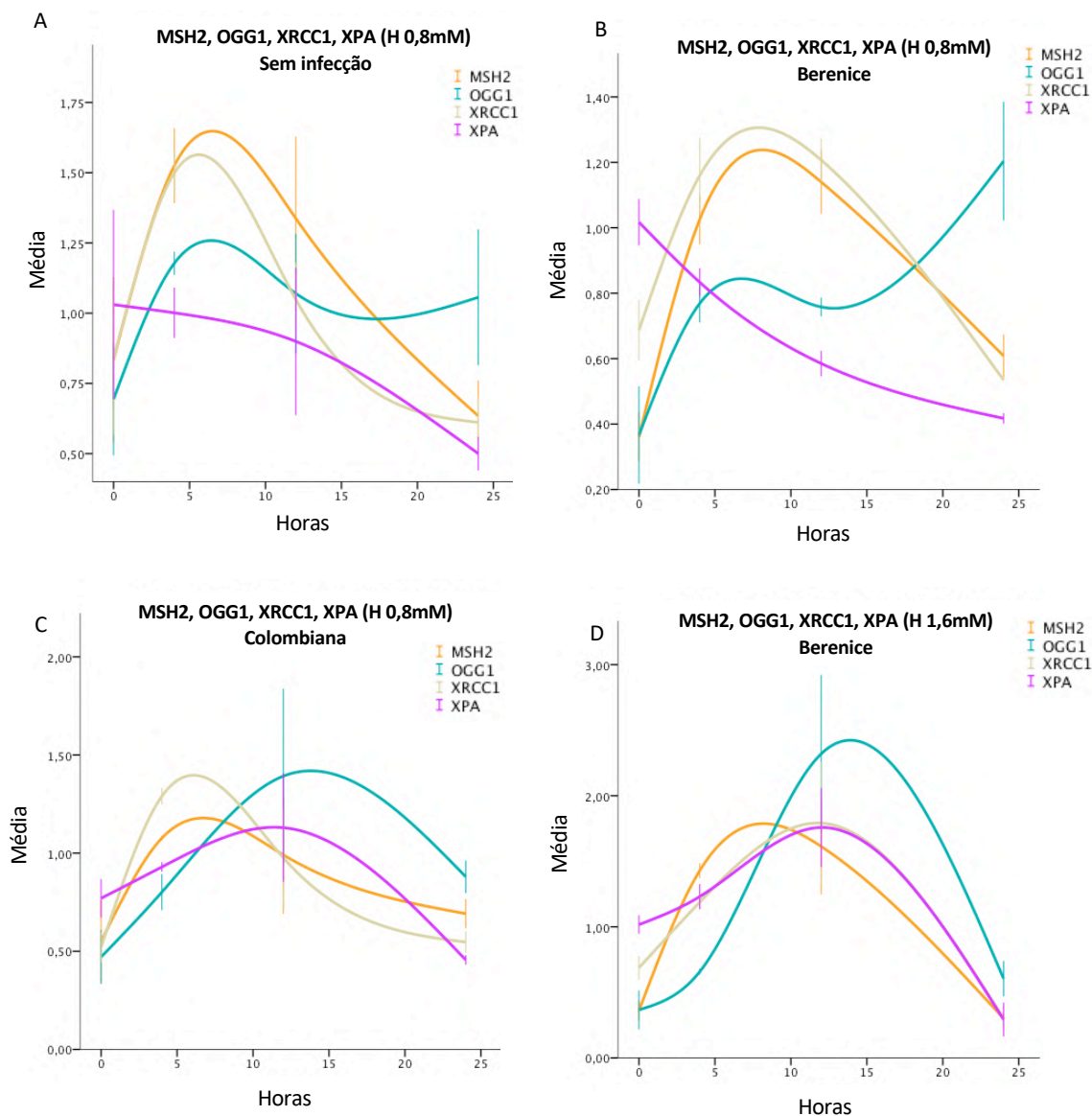


Figura 54. Correlação de expressão de genes de BER, NER e MMR em células tratadas com peróxido de hidrogênio. A) Expressão de *Msh2*, *Ogg1*, *Xrcc1* e *Xpa* de células L6 sem infecção tratadas com H₂O₂ 0,8mM. Não há correlação entre *Xpa* e os outros genes B) Expressão de *Msh2*, *Ogg1*, *Xrcc1* e *Xpa* de células L6 infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com H₂O₂ 0,8mM. *Xpa* e *Ogg1* apresentam relação inversamente proporcional. C) Expressão de *Msh2*, *Ogg1*, *Xrcc1* e *Xpa* de células L6 infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com H₂O₂ 0,8mM. D) Expressão de *Msh2*, *Ogg1*, *Xrcc1* e *Xpa* de células L6 infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com H₂O₂ 1,6 mM.

Encontra-se correlação entre a expressão de *Atm*, *P21* e *P53* em células infectadas com *T. cruzi* Berenice, no tratamento com 1,6mM (coeficientes de correlação: *Atm* e *P21* = 0,716, $p < 0,01$; *Atm* e *P53* = 0,694, $p < 0,05$; *p53* e *p21* = 0,971, $p < 0,001$). Nos demais grupos, não há correlação entre estes três genes, apenas entre *P21* e *P53*: para sem infecção (correlação = 0,961, $p < 0,001$); e para Colombiana (correlação = 0,928, $p < 0,001$). A Figura 55 apresenta as correlações entre *Atm*, *P21* e *P53*.

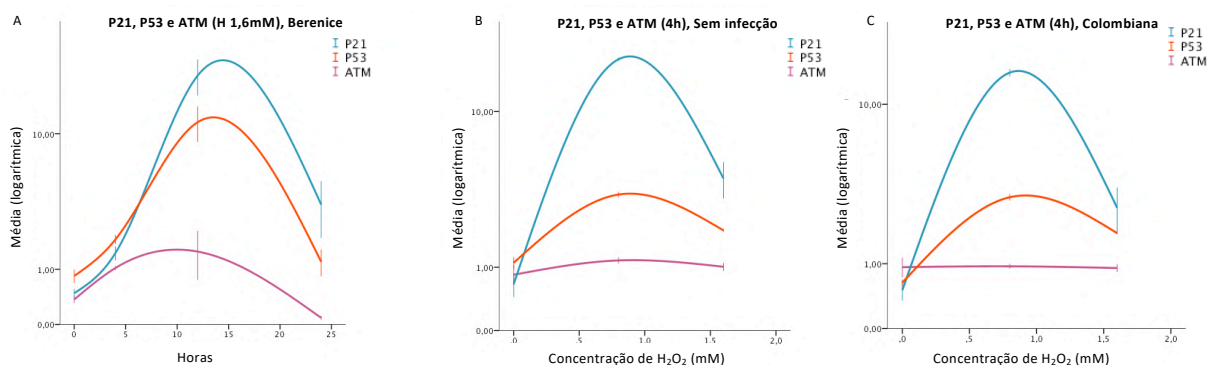


Figura 55. Correlação de expressão de *Atm*, *P21* e *P53* em células L6, infectadas ou não com *Trypanosoma cruzi*, tratadas com peróxido de hidrogênio. A) Expressão de *Atm*, *P53* e *P21* de células L6 infectadas com *T. cruzi* Berenice e tratadas com H_2O_2 1,6mM. B) Expressão de *Atm*, *P53* e *P21* de células L6 não infectadas imediatamente após tratamento com H_2O_2 . C) Expressão de *Atm*, *P53* e *P21* de células L6 infectadas com *T. cruzi* Colombiana imediatamente após tratamento com H_2O_2 .

4.3 Efeito do Peróxido de Hidrogênio no *Trypanosoma cruzi*

4.3.1 Efeito na mortalidade de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com H_2O_2 1,6mM nas mesmas condições das células L6 (4 horas de tratamento + 8h ou 12h de recuperação). A viabilidade dos parasitos caiu para quase 60% após o período de recuperação (24h). Não houve diferença significativa na viabilidade das cepas Colombiana e Berenice. Interessantemente, com o passar do tempo do tratamento, aumentou-se a incidência de formas arredondadas do parasito (esferomastigotas) (Figura 56).

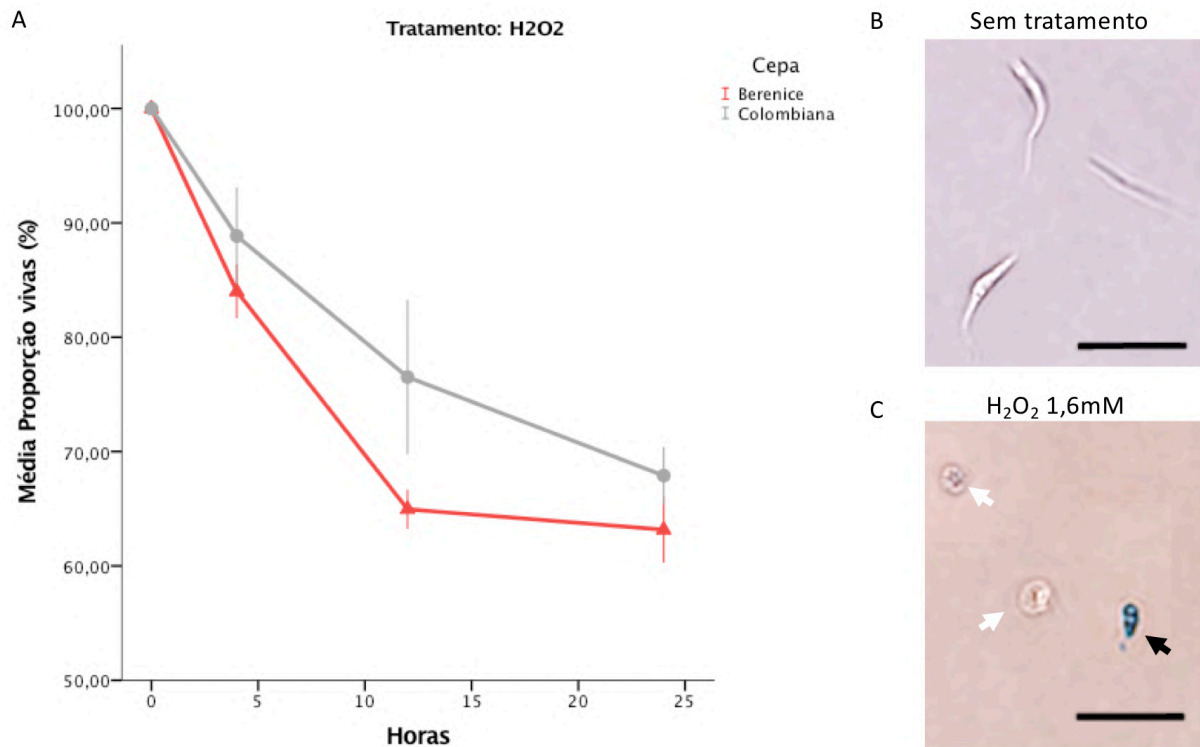


Figura 56. Viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com Peróxido de Hidrogênio 1,6mM. A) Viabilidade de formas epimastigotas tratadas com H₂O₂ 1,6mM ao longo do tempo. B) Micrografia de células vivas não tratadas de epimastigotas de *T. cruzi*, coradas com azul de tripan. C) Micrografia de *T. cruzi* tratados com H₂O₂ 1,6 mM por 4h, e avaliados após período de recuperação, 24h após o início do tratamento, coradas com azul de tripan. As setas brancas mostram células vivas na forma de esferomastigota. A seta preta indica célula morta. A barra de escala corresponde a 20µm.

4.3.2 Efeito na parasitemia de células infectadas com *Trypanosoma cruzi* e tratadas com Peróxido de Hidrogênio

A partir da quantificação do gene constitutivo *Tc40S*, estimou-se a quantidade de parasitos em amostras tratadas com H₂O₂ ao longo do tempo. Não houve alteração na quantidade de parasitos no tratamento com H₂O₂ 0,8mM. Já o tratamento com H₂O₂ 1,6mM apresentou uma redução na quantidade de *T. cruzi* Berenice, desde as primeiras 4h de tratamento, e o número absoluto de parasitos se manteve constante nos tempos seguintes. Quando comparado com a quantidade de células L6, a proporção de Berenice aumenta significativamente ($p < 0,01$) durante o período de recuperação (24h). Não há alteração significativa na quantidade de *T. cruzi* Colombiana no tratamento com H₂O₂, em nenhuma condição avaliada (Figura 57).

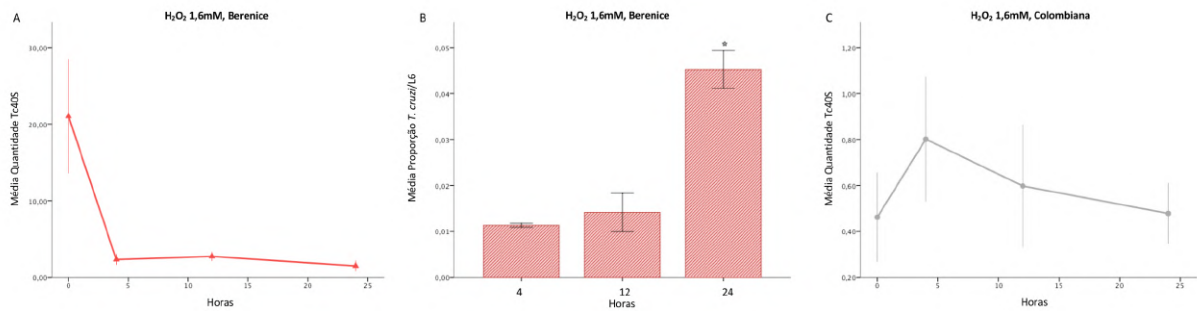


Figura 57. Quantidade de *Trypanosoma cruzi* em células tratadas com peróxido de hidrogênio 1,6mM, a partir da quantificação de *Tc40S*. A) Quantidade de parasitos da cepa Berenice em células infectadas, no tratamento com H_2O_2 1,6mM, ao longo do tempo. B) Quantidade de parasitos da cepa Berenice em células infectadas, durante tratamento com H_2O_2 1,6mM e recuperação. C) Quantidade de parasitos da cepa Colombiana em células infectadas, no tratamento com H_2O_2 1,6mM, ao longo do tempo. Não há alteração na quantidade de Colombiana no tratamento com H_2O_2 .

4.3.3 Efeito do tratamento de H_2O_2 na expressão de genes de reparo de *Trypanosoma cruzi*

Ao se avaliar a expressão de *TcPCNA* e *TcMSH2* da cepa Berenice percebe-se que, imediatamente após o tratamento com H_2O_2 0,8mM (4h), há aumento na expressão de *TcPCNA* ($p < 0,01$), que permanece significativo nas 8 horas seguintes de recuperação. O tratamento mais intenso, com 1,6mM, levou ao aumento da expressão de *TcMSH2* ($p < 0,05$) e *TcPCNA* ($p < 0,05$) no período de recuperação, especificamente às 12h (Figura 58).

A alteração na expressão de *TcPCNA* e *TcMSH2* para *T. cruzi* Colombiana só foi significativa no tratamento com H_2O_2 1,6mM, ambos no período de recuperação. *TcPCNA* teve expressão aumentada às 12h após o início do tratamento ($p < 0,001$), e normalização nas horas seguintes. *TcMSH2* também foi mais expresso às 12h ($p < 0,001$), onde se observou seu pico de expressão. No restante do período de recuperação (24h), a expressão manteve-se superior ao nível basal ($p < 0,05$) (Figura 58).

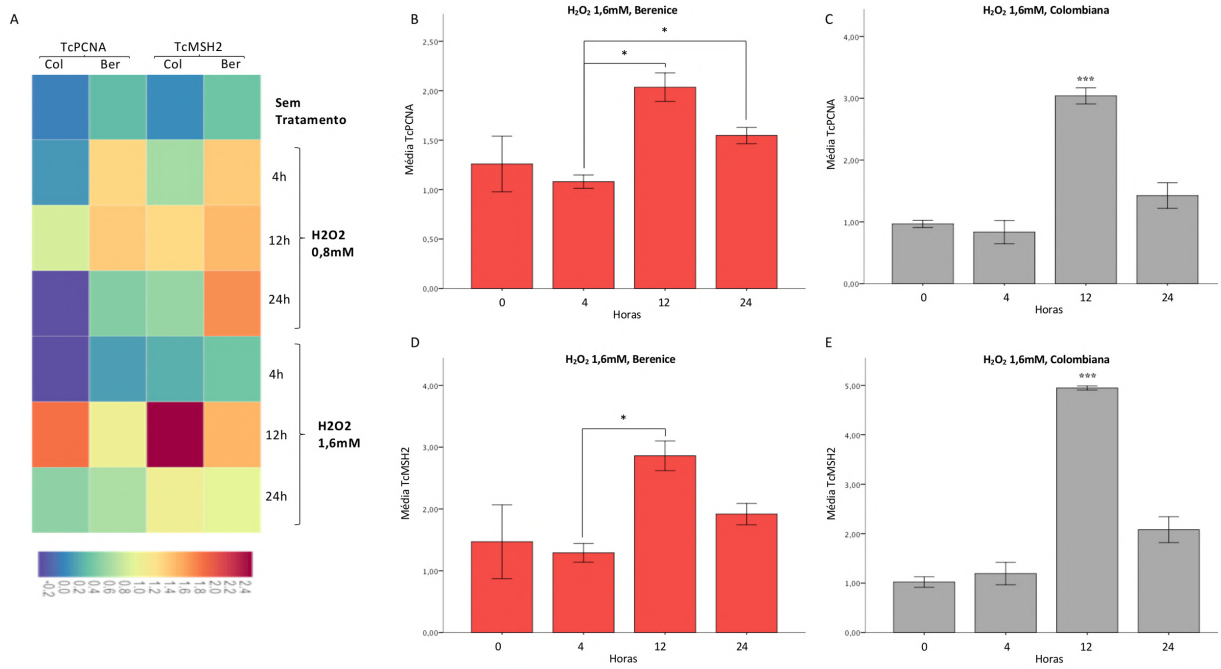


Figura 58. Expressão de genes de reparo de *Trypanosoma cruzi* no tratamento com Peróxido de Hidrogênio.

A) Heatmap de expressão de *TcPCNA* e *TcMSH2* no tratamento com H₂O₂. B) Expressão de *TcPCNA* da cepa Berenice, no tratamento com H₂O₂ 1,6mM. C) Expressão de *TcPCNA* da cepa Colombiana, no tratamento com H₂O₂ 1,6mM. D) Expressão de *TcMSH2* da cepa Berenice, no tratamento com H₂O₂ 1,6mM. E) Expressão de *TcMSH2* da cepa Colombiana, no tratamento com H₂O₂ 1,6mM. * p <0,05; *** p<0,001.

VI. Discussão

1 Efeito da infecção na célula L6

Formas tripomastigotas são capazes de infectar uma variedade de tipos celulares, incluindo células fagocíticas e não fagocíticas. A invasão em células não fagocíticas, como células L6, envolve uma orquestração de eventos celulares que levam a uma remodelação de microfilamentos de actina, invaginação da membrana plasmática e fusão lisossomal, que favorecem a internalização do parasito e formação do vacúolo parasitóforo. Algumas horas depois da internalização, o *T. cruzi* escapa do vacúolo, adquirindo localização citoplasmática, e, nas próximas 24h pós infecção, diferencia-se na forma replicativa amastigota. A divisão binária costuma ocorrer a cada 12h, e no curso de 3-5 dias, já existem dezenas de parasitos intracelulares em uma única célula (COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009). Com uma alta densidade, os amastigotas diferenciam-se para tripomastigotas, que escapam das células e infectam novas células (TYLER; ENGMAN, 2001). Segundo Dumoulin e Burleigh (2018), este ciclo leva quase 3 dias para a cepa Tulahuén (DTU Tc VI), desde a internalização do parasito até a liberação de formas tripomastigotas. Às 66h, ainda existem apenas formas amastigotas no citoplasma do hospedeiro (DUMOULIN; BURLEIGH, 2018).

Nos experimentos realizados, na ausência de tratamento, de 50% a 70% das células haviam sido infectadas (Figura 9 e Figura 10), porcentagens que variaram de acordo com a técnica utilizada para a detecção da parasitemia. Portanto, a concentração de 5x mais parasitos que células e o tempo de 72h de infecção se mostrou válida para a continuação dos experimentos, visto que uma quantidade importante de células infectadas poderia ser avaliada (VARGAS-ZAMBRANO *et al.*, 2013). Embora cepas pertencentes a DTU Tc II se mostrem mais infectivas *in vivo*, estudos *in vitro* indicam que a cepa DTU TcI é capaz de infectar mais células que DTU TcII, dependendo do tipo celular (ANDRADE *et al.*, 2010). E, de fato, nos ensaios de parasitemia, a cepa Colombiana infectou uma proporção maior de células L6 que a cepa a Berenice.

De interesse, a infecção provocou maior mortalidade, independente da cepa (Figura 11), porém esta mortalidade se manteve em cerca de 10%, não sendo, portanto, tão proeminente ao se considerar a população total de células. Ainda que estudos mostrem que diferentes cepas do parasito possam promover citoproteção ou aumentar a morte celular (REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020), não foi o que verificamos para as cepas de nosso estudo, onde ambas se comportaram de maneira similar quanto à promoção da morte celular.

As células L6, mioblastos de rato, são células hospedeiras habituais do *T. cruzi* e bastante permissivas à infecção. Em cardiomiócitos de rato, foi relatado que tripomastigotas da

cepa Y (DTU Tc II) favorece a indução de apoptose, *in vitro*, devido à superexpressão do gene apoptótico *bax* (STAHL *et al.*, 2013). Nosso ensaio de anexina/PI, no entanto, não demonstrou diferença no tipo de mortalidade (se apoptose, apoptose tardia ou necrose) (Figura 11). E, de fato, não houve diferença na expressão de *P53* ou *Bcl2* entre células infectadas e não infectadas, não sendo detectadas, portanto, diferenças na promoção de apoptose por parte do parasito.

Ressalta-se também que, apesar de a mortalidade apresentada ser maior em células infectadas, avaliando-se a proporção do sub-G1, não há diferenças quanto à degradação de DNA entre células infectadas e não infectadas, e nem diferença na expressão de nenhum gene referente ao reparo. Ademais, a infecção não provocou alteração no ciclo celular de células L6, permanecendo igual ao do controle (Figura 12D). Isso demonstra uma harmoniosa convivência entre o *T. cruzi* e sua célula hospedeira, refletindo um equilíbrio que foi adquirido após milhares de anos de co-evolução (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A esse respeito, sabe-se que microrganismos intracelulares são capazes de atuar sobre vias de sinalização e sobre a integridade genômica do hospedeiro, utilizando-se de uma gama de estratégias para usufruir ou inativar a maquinaria de resposta a danos ao DNA (DDR) e possibilitando a sobrevivência de ambos (WEITZMAN; WEITZMAN, 2014).

Diferindo de nossos resultados, WEITZMAN e WEITZMAN (2014) verificaram que a presença do parasito por si só pode relacionar-se com a modulação das mitocôndrias e níveis de ROS da célula hospedeira, resultando em lesões para a fita-simples ou fita-dupla do DNA. Também há relatos da influência da infecção por *T. cruzi* na expressão gênica. Manque *et al* (2011) demonstrou que 353 genes de cardiomiócitos foram diferencialmente expressos durante pelo menos uma das três diferentes fases de infecção do parasito (inicial, intermediária e tardia), sendo afetado um amplo espectro de processos funcionais celulares. Foram encontradas, entre tantas outras, alterações de genes relacionados à morte e ciclo celulares, replicação, recombinação e reparo de DNA e metabolismo de ácidos nucleicos (MANQUE *et al.*, 2011). Em células HeLa, o parasito também reprograma a expressão de uma série de genes relacionados à apoptose, reparo de DNA e controle do ciclo celular (CHIRIBAO *et al.*, 2014). Em relação ao ciclo celular, alguns autores sugerem que *T. cruzi* é capaz de inibir a progressão do ciclo celular da célula hospedeira, especialmente nas fases tardias do ciclo, levando à formação de células multinucleadas (COSTALES; DAILY; BURLEIGH, 2009). Fibroblastos infectados apresentam alteração em uma série de genes relacionados ao ciclo celular, indicando que a infecção por *T. cruzi* induz a célula a entrar na fase S nas primeiras 24h de infecção, com um posterior bloqueio da citocinese nas horas seguintes (LI *et al.*, 2016). No presente estudo, a infecção por si só não interferiu na expressão de nenhum dos genes analisados, não lesionou o

DNA e não alterou o ciclo celular, o que pode estar relacionado à linhagem celular ou às cepas utilizadas (DE SOUZA *et al.*, 2003; HEUSSLER; ÈENZI; ROTTENBERG, 2001).

Quanto à proliferação celular, verificou-se que células infectadas com a cepa Colombiana apresentaram, no entanto, uma redução significativa no número de colônias (Figura 12A e B). Como não há diferença estatística do número de células sozinhas entre o grupo infectado por Colombiana e não infectado, e também não há alteração no ciclo celular e nem na expressão de *P16*, *P21* e *Ki67*, possivelmente o menor número de colônias não se deu por uma menor proliferação, e sim por uma maior mortalidade, que impediu as células de formarem colônias.

2 Tratamento com cisplatina

2.1 Efeito da cisplatina na célula L6

A cisplatina é uma droga antitumoral que causa dano ao DNA, como demonstrado em nossos experimentos, e que induz espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a morte celular (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014). Tanto a mortalidade como a degradação de DNA induzida por cisplatina apenas foram perceptíveis após um período de recuperação, não sendo evidente imediatamente após o tratamento (Figura 13). Isso é explicado pela própria dinâmica da lesão por cisplatina que, por ser intercalante, leva a uma parada na maquinaria de replicação celular, provocando suspensão do ciclo celular na fase S/G2. Assim, durante a mitose, ocorre a parada da maquinaria de replicação e consequente DSB e apoptose. É por isso que a degradação de DNA e a morte celular só é detectável em cerca de 24h após o tratamento com cisplatina (DEMARCO *et al.*, 1994; SIDDIK, 2003).

O tratamento com cisplatina levou a um aumento na expressão de *P53* nas 24h após o início do tratamento (Figura 24). A *P53* está entre as proteínas centrais de reconhecimento do dano de DNA se ligando por afinidade ao DNA com cisplatina e promovendo a parada do ciclo celular e apoptose (O'GRADY *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2015). Ressalta-se que, apesar de a *P53* estar envolvida nos mecanismos de morte celular quando as lesões são severas e prolongadas, ela também tem um importante papel no reparo de pequenas e moderadas lesões por cisplatina, promovendo o mecanismo de sobrevivência celular. Quando as lesões são severas e prolongadas *P53* está mais envolvida nos mecanismos de morte celular (ZHU *et al.*, 2015). Isso explica por que não há alterações na expressão de *Bcl2*, um gene supressor de apoptose, no tratamento a 25µM de cisplatina, uma concentração que ocasiona um

dano mais brando, no qual a P53 estaria envolvida no reparo. Já a 100µM de cisplatina, há redução na expressão de *Bcl2* (Figura 24), demonstrando que a melhor via de proteção do organismo a um dano severo é a apoptose.

Em células não infectadas, o tratamento com concentrações cada vez maiores de cisplatina levou a um aumento na expressão de *Pcna* e *Rad51* logo nas primeiras horas pós tratamento (Figura 25). A 25µM, as células exibiram aumento na expressão de *Atm* e de *Msh2* (Figura 25 e Figura 26). Interessantemente, MSH2 é ativado via ATR e está relacionado com a via MMR, que é ineficaz para lesões de cisplatina. Apesar de MSH2 reconhecer os adutos de cisplatina, não consegue reparar eficientemente, resultando nos “ciclos fúteis” de MMR, que eventualmente levam à quebra de dupla fita e consequente apoptose, caso nenhuma outra via seja ativada pelas DSBs (O’GRADY *et al.*, 2014). Há também aumento na expressão de *Ogg1*, um gene da via BER, responsável pelo reparo de 8-oxo-G (SEIFERMANN; EPE, 2017), apenas no tratamento de 25µM (Figura 26F). A maior ativação da expressão de *Ogg1* provavelmente está relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio por parte da lesão da cisplatina (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014). A via BER também não é eficaz no reparo de adutos de DNA induzidos pela cisplatina (O’GRADY *et al.*, 2014). A correlação entre a expressão de *Ogg1* e *Msh2* parece indicar que, em células não infectadas, o reparo deve ser feito preferencialmente via MMR e BER (Figura 33C), duas vias ineficazes, o que pode resultar em acúmulo de danos no DNA (Figura 19).

Alguns autores especulam que o reparo ao DNA é induzido nas fases iniciais do dano causado pela cisplatina, mas inativado na presença de danos prolongados ou severos (ZHU *et al.*, 2015). Talvez por isso se detectou a parada nas fases S/G2 e ativação da expressão de *Atm* e *Rad51* apenas em danos não severos, já que a parada na fase S/G2 é característica do reparo HR, que necessita do alinhamento das cromátides e de um DNA mais íntegro (HEYER; EHMSSEN; LIU, 2010).

O tratamento com cisplatina 25µM levou a uma maior expressão de *Brcal* nas 24h pós início do tratamento. BRCA1 é um importante fator de reparo de quebras de dupla fita via HR, mas também pode ter papel em NHEJ, NER e ativação de *checkpoints* (O’GRADY *et al.*, 2014). Entretanto, verificamos também uma redução significativa de *Xrcc4* no tratamento com cisplatina em células não infectadas (Figura 25), indicando que, provavelmente, não está sendo ativada a via NHEJ (APARICIO; BAER; GAUTIER, 2014). E, de fato, análises de correlação mostram uma relação inversa entre a expressão de *Rad51* (um gene chave de HR) e *Xrcc4* (gene chave de NHEJ), apenas no tratamento com 25µM de cisplatina (Figura 32C).

Imediatamente após o tratamento mais intenso (100 μ M), não houve alteração na expressão de *Atm*, *Rad51*, *Msh2* e nem parada no ciclo celular, sugerindo que provavelmente, em lesões mais severas, não há ativação do reparo, ao menos maior ativação na expressão destes genes, levando conseqüentemente à maior expressão de *P53* e redução de *Bcl2*, que indica maior mortalidade por apoptose e apoptose tardia, evidentes nos ensaios com anexina/PI (Figura 16). Ressalta-se também que o tratamento com altas concentrações de cisplatina levou a uma maior mortalidade por necrose (Figura 16). Já foi relatada a presença de necrose e apoptose ocorrendo simultaneamente em população de células expostas à cisplatina (TROYANO *et al.*, 2003). Sabe-se que a cisplatina causa danos em outras moléculas além do DNA, e, em altas doses, pode afetar moléculas envolvidas com o suprimento de energia (ATP) e outras proteínas indiretamente envolvidas no processo apoptótico, levando à morte por necrose. Portanto, dependendo da concentração de cisplatina e nível do dano induzido, a necrose pode ocorrer diretamente ou como consequência de um programa apoptótico interrompido (GONZALEZ *et al.*, 2001). Também existe a possibilidade de necrose programada, um tipo de mortalidade celular descrita recentemente, e que pode estar relacionada a danos e degradação ao DNA detectados via PARP1 (BERGHE *et al.*, 2014).

O tratamento com cisplatina levou a uma parada na proliferação, com ausência total na formação de colônias (Figura 20). Em células tratadas com cisplatina 25 μ M, foi evidente a aquisição de um perfil senescente, com alteração da morfologia e aumento de expressão de *P53* e de *P21* logo nas primeiras 4h de tratamento, o que corrobora com a literatura (HE; SHARPLESS, 2017). A saber, *P21* é um dos maiores executores de *P53*, pois é um potente inibidor de ciclo celular (CERELLA *et al.*, 2016). Também foi registrada a parada do ciclo celular às 24h do tratamento com cisplatina 25 μ M, onde há um aumento significativo na expressão de *P21*. De interesse, a senescência celular é, juntamente com a apoptose, um dos eventos-chave na resposta anticâncer (CERELLA *et al.*, 2016).

Curiosamente, há redução na expressão de *P16* em células não infectadas e tratadas com cisplatina 25 μ M (Figura 29 e Figura 30). Também não há alteração na expressão de *Ki67* (Figura 29 e Figura 30). Sabe-se que *Ki67* é uma proteína relacionada à proliferação celular e está presente em todas as fases ativas do ciclo celular e ausente em células quiescentes (em G0) (LI *et al.*, 2015). Desta forma, a não redução na expressão de *Ki67* e de *P16* parece indicar que as células não entraram em senescência de fato, apenas reduziram sua proliferação. A parada no ciclo celular reforça a ideia de um reparo via HR, onde é necessário que cromátides irmãs estejam alinhadas (HEYER; EHMSSEN; LIU, 2010).

Com o tratamento severo de cisplatina (100 μ M), além da maior necrose celular e degradação significativa de DNA (Figura 17 e Figura 18), não se observa alteração na morfologia e não há alteração na expressão de *P16*, *P21* e *Ki67* (Figura 29). Não há também formação de colônias (Figura 20). Isso indica um reparo ineficaz nessa concentração.

Interessantemente, o resultado do cometa neutro aponta que praticamente toda a degradação encontrada no tratamento a 100 μ M não se trata de DSB, mas sim de quebra de simples fita (Figura 19). As SSBs surgem a partir de instabilidades de DNA, e, se não reparadas, levam à formação de DSBs. A ATM parece ter um papel importante no reparo de SSB e prevenção de DSBs, juntamente com XRCC1 e DNA Ligase III (KHORONENKOVA; DIANOV, 2015). No entanto, nestas condições, não houve alteração significativa na expressão destes genes.

Também no tratamento mais forte, não há acúmulo de células na fase S/G2, o que ocorre no tratamento de 25 μ M de cisplatina (Figura 21 e Figura 23). Isso talvez se dê porque o reparo à cisplatina é inativado na presença de danos severos ou prolongados (ZHU *et al.*, 2015). Nessa condição (100 μ M), existe correlação na expressão de *Atm*, *P53*, *P21* (Figura 34). Sabe-se que ATM pode atuar como um *checkpoint* do ciclo celular, como resposta à exposição ao estresse. Vias envolvendo complexos de ATM-p53-p21, como também ATM-Chk2-CDC25A controlam a parada do ciclo celular nas fases G1/S. A correlação no aumento de expressão destes três genes no tratamento a 100 μ M corrobora com o detectado pela citometria, onde há parada na fase G1/S (JIN; OH, 2019).

A Figura 59 apresenta um modelo do efeito da cisplatina na célula L6

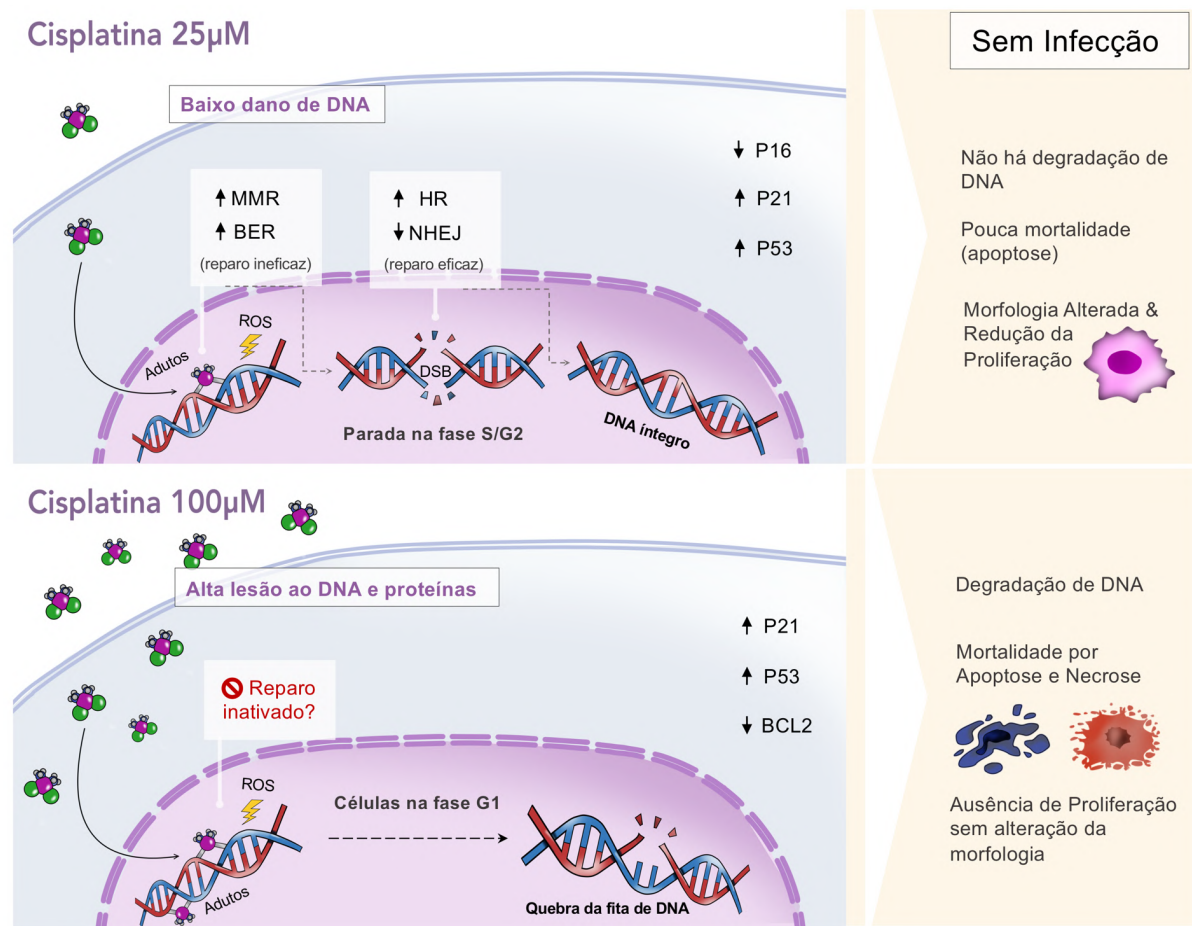


Figura 59. Efeito da cisplatina em células L6. Após tratamento com 25µM de cisplatina, células L6 parecem apresentar ativação nas vias MMR e BER, ineficazes para reparo de cisplatina. Há aparente ativação da via HR, confirmado pela parada no ciclo celular. Também há inativação da via NHEJ. Não há alteração de genes específicos da via NER. Sugere-se que o reparo inicial via MMR e BER leve à quebra de dupla fita (DSB), reparada via HR. Por ser um reparo eficaz, nessas condições, não há degradação significativa de DNA e a pouca mortalidade detectada se dá principalmente por apoptose, mesmo sem alteração na expressão de *Bcl2*. Nota-se redução da proliferação e morfologia alterada, com células achatadas e alargadas, sugerindo senescência. A maior expressão de *P21* e *P53* corroboram com esse fenótipo. No entanto, não há alteração de *Ki67* e há redução de *P16*, um marcador senescente. O tratamento a 100µM parece inativar algumas vias de reparo. Nessa condição, detecta-se maior degradação de DNA e mortalidade por apoptose e necrose, confirmando que tratamentos mais intensos desencadeiam mortalidade celular. A maior apoptose também é explicada pela redução de expressão do gene anti apoptótico *Bcl2* e maior expressão de *P53*. A morfologia celular não aponta para um aspecto senescente, embora *P21* esteja mais expresso.

2.2 Influência da cisplatina no *Trypanosoma cruzi*

O tratamento dos parasitos com cisplatina 100µM mostrou que ambas as cepas apresentam resistência à droga maior que as células L6, com cerca de 15% de mortalidade após o período de recuperação (24h) (Figura 35). Embora existam registros de que a cepa Colombiana (DTU TcI) é mais sensível à cisplatina que Berenice (DTU TcII), por causa da

variação dos isotipos de MSH2 (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2011b; MACHADO *et al.*, 2006), no presente estudo não houve diferença significativa entre as cepas.

Embora o ensaio com formas epimastigotas não apresente mortalidade alta, o número absoluto de parasitos da cepa Berenice em culturas infectadas reduziu significativamente desde as primeiras horas com o tratamento com cisplatina, com redução ainda maior no período de recuperação (24h) (Figura 36). Talvez, a cisplatina tenha reduzido a proliferação das formas amastigotas, mas também pode ter ocorrido morte dos parasitos. A proporção de parasitos por célula também caiu, tanto que, às 24h, a quantidade de *T. cruzi* Berenice por célula foi significativamente menor. Durante o tratamento, independentemente da concentração, os parasitos Berenice aumentaram a expressão de *TcPCNA*, que, na recuperação, voltou aos níveis basais. Só houve alteração na expressão de *TcMSH2* no tratamento a 100µM, onde há um aumento na expressão deste gene nas primeiras horas do tratamento, com normalização nas horas seguintes. Sabe-se que a via MMR não é eficaz no tratamento com cisplatina, talvez por isso há redução no número de parasitos Berenice ao longo do tempo.

Curiosamente, a cepa Colombiana, que na literatura é descrita como mais sensível à cisplatina (CAMPOS *et al.*, 2011b), apresentou aumento significativo na quantidade de parasitos intracelulares no tratamento mais intenso de 100µM após 24h (Figura 36). Aparentemente, passado o dano inicial, os parasitos voltam a se proliferar ativamente dentro das células. O comportamento de expressão gênica dos parasitos Colombiana foram o contrário dos de Berenice. Durante o tratamento com cisplatina, não houve alteração na expressão de *TcPCNA*. Mas, durante o período de recuperação do tratamento com cisplatina 25µM, os parasitos Colombiana reduziram sua expressão de *TcPCNA*. Como Berenice, só houve aumento na expressão de *TcMSH2* no tratamento mais intenso, apenas no período de recuperação. Interessantemente, a maior expressão de *TcMSH2* de Colombiana coincidiu com a maior quantidade de parasitos nas células no período pós lesão.

2.3 Influência da cepa Berenice de *Trypanosoma cruzi* em células L6 tratadas com cisplatina

Células infectadas com *T. cruzi* Berenice, submetidas a tratamento com cisplatina, apresentaram mortalidade significativamente maior que os demais grupos (Figuras 14 e 15). Como esperado, a diferença na mortalidade se deu apenas após o período de recuperação, devido à dinâmica da lesão por cisplatina (DEMARCQ *et al.*, 1994; SIDDIK, 2003). Células infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentaram maior mortalidade por necrose que células não

infectadas, o que pode estar relacionado ao maior dano ao DNA e estresse celular induzido pela infecção (Figura 16).

É interessante destacar a maior expressão de *P53* em células infectadas, desde as 4 primeiras horas após o tratamento com cisplatina, com superexpressão às 24h (Figura 24). Existem evidências de que protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa podem afetar diretamente a via da p53 da célula hospedeira. Parasitos também podem afetar indiretamente a integridade do genoma, por meio da produção de ROS, organização espacial de estruturas celulares e reprogramação epigenética (WEITZMAN; WEITZMAN, 2014). Ressalta-se também que, imediatamente após o tratamento (12h), as células infectadas apresentam expressão de *P53* significativamente reduzida. Já no tratamento mais intenso com cisplatina (100 μ M), em células infectadas há uma redução significativamente maior na expressão de *Bcl2* que em células não infectadas, imediatamente após o tratamento, o que pode ter favorecido a apoptose.

O resultado do teste do cometa corroborou com o encontrado em sub-G1, ou seja, o aumento da concentração de cisplatina aumenta a degradação de DNA de forma significativa, e Berenice apresenta muito mais degradação de DNA que os demais grupos (Figuras 17 e 18). Essa maior degradação pode estar diretamente associada à apoptose ou diz respeito a alterações na expressão da maquinaria de reparo para uma via menos eficiente. Apenas em células infectadas com Berenice, a degradação de DNA ocorreu mesmo em doses mais baixas de cisplatina (25 μ M), corroborando com a ideia de um reparo ineficaz. No tratamento mais severo (100 μ M), a degradação foi ainda maior em células infectadas com *T. cruzi* Berenice. Interessantemente, os resultados do teste do cometa neutro indicam que, embora apenas 1/3 da degradação de DNA seja DSB, a infecção por Berenice provoca significativamente mais DSB que os outros grupos, após o tratamento com cisplatina 100 μ M (Figura 19).

Também em grupos infectados com a cepa Berenice, ocorreu um aumento na expressão de *Atm* durante o tratamento com cisplatina 25 μ M, mas foi menor que em células sem infecção. O tratamento com menores doses de cisplatina também provocou aumento na expressão de *Brcal* em células que passaram pelo período de recuperação. Mesmo expressando mais *Brcal* em comparação aos níveis basais, células infectadas com Berenice expressaram significativamente menos *Brcal* que células não infectadas. O mesmo ocorre com a expressão de *Rad51*. Apesar de aumentar a expressão deste gene em comparação à célula não tratada, a expressão de *Rad51* em células infectadas com Berenice foi menor que em células não infectadas. Ou seja, embora continue havendo ativação da expressão de *Atm*, *Brcal* e *Rad51*, a infecção com a cepa Berenice induz a uma ativação menos intensa desses genes, no tratamento

com cisplatina 25µM, reduzindo provavelmente o reparo por HR (Figuras 25 e 26). Isso explicaria a maior degradação de DNA encontrada no teste do cometa. No tratamento mais intenso, apenas células infectadas com Berenice apresentam ativação da expressão do gene *Atm*, nas primeiras 4h, retornando ao longo do tratamento aos níveis basais. No entanto, há correlação na expressão de *Rad51*, *Atm* e *Brcal* em consequência do aumento da concentração de cisplatina em células infectadas com Berenice, indicando que o reparo por HR de fato deve estar ocorrendo nessas células (Figura 31), ainda que de maneira menos eficaz.

Embora a expressão de *Pcna* aumente com o tratamento, nas primeiras 12h, a infecção leva a uma expressão relativamente menor que em células não infectadas (Figura 26). O antígeno nuclear de proliferação celular, PCNA, está envolvido em uma série de mecanismos celulares, incluindo reparo por MMR, reparo de quebra de fita de DNA e TLS, além de estar envolvido na proliferação celular (Boehm et al, 2016). Também tem um papel importante na HR, por estimular polimerases a sintetizar a nova fita de DNA com mais eficiência (Li et al, 2013). Há também aparente redução da expressão de *Xrcc4* ao longo do tempo (Figura Figura 25), indicando uma redução da atividade de NHEJ.

Células infectadas com Berenice apresentaram um aumento na expressão de *Msh2* nas primeiras horas de tratamento, mas imediatamente após o fim do tratamento, ou seja, às 12h, há uma queda na expressão de *Msh2*. A 100µM, enquanto células não infectadas não apresentam alteração na expressão de *Msh2*, em culturas infectadas com a cepa Berenice, esse gene possui expressão aumentada desde as 4 primeiras horas do tratamento, o que sugere uma indução via MMR durante tratamento intenso de cisplatina. Como MMR é uma via que não repara danos por cisplatina eficientemente, este pode ser o fator envolvido no fato de células infectadas pela cepa Berenice apresentarem maior mortalidade (Figuras 25, 26 e 27).

Nas primeiras 4h de tratamento, há também aumento na expressão de *Rpal*, uma proteína da via NER eficaz no tratamento com cisplatina (O'GRADY *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015). No entanto há redução na expressão de *Xpa*, outra proteína chave da via NER. Em células infectadas por Berenice, encontramos também maior ativação da expressão de *Ogg1*, significativo apenas no fim do tratamento com cisplatina 25µM. Testes de correlação entre a expressão de *Ogg1* (via BER) e *Xpa* (via NER), indicam que, em células infectadas por Berenice, há preferência pela via BER, no reparo à lesão por cisplatina 100µM (Figura 33). A via BER não tem se mostrado eficaz para este tipo de dano (O'GRADY *et al.*, 2014), o que, novamente, corrobora para o aumento da degradação de DNA e mortalidade.

Células infectadas por Berenice apresentaram peculiaridades na proliferação durante o tratamento com cisplatina. Apesar de o tratamento com cisplatina 25µM não permitir a

formação de colônias, culturas infectadas com Berenice apresentaram significativamente mais grupos de 2 a 49 células, ou seja, apesar de ter havido redução na proliferação, células infectadas com Berenice se dividiram mais que células infectadas com Colombiana. Isso indica que o reparo menos eficaz permite a proliferação celular mesmo na presença de danos ao DNA, o que poderia favorecer o surgimento de células cancerígenas (ROOS; THOMAS; KAINA, 2016).

Em Berenice, o tamanho de L6 não se alterou, diferentemente dos outros grupos, o que aponta para uma possível não indução da senescência. Corroborando com este resultado, não houve alteração na expressão de *P16* em células infectadas com *T. cruzi* Berenice (Figura 29). A infecção pelo parasito também provocou redução da expressão de *Ki67* desde as 4 primeiras horas de tratamento com cisplatina, ou seja, a infecção induz parada na replicação celular nos primeiros tempos de tratamento. De interesse, *Ki67* está ausente em células quiescentes e é pouco expresso nas fases G1 e S, tendo um pico nas fases iniciais da mitose (LI *et al.*, 2015). Quanto a *P21*, há aumento em sua expressão, mas é significativamente menor em células infectadas com *T. cruzi*. Com relação ao ciclo celular, não há alteração em comparação com células não infectadas, inclusive com correlação entre as expressões de *Atm*, *P53* e *P21* no tratamento com cisplatina 100 μ M, indicando um possível controle molecular na parada do ciclo celular na fase G1/S (Figura 34). O resumo dos eventos observados em células L6 com *T. cruzi* Berenice e tratadas com cisplatina está representado na Figura 60.

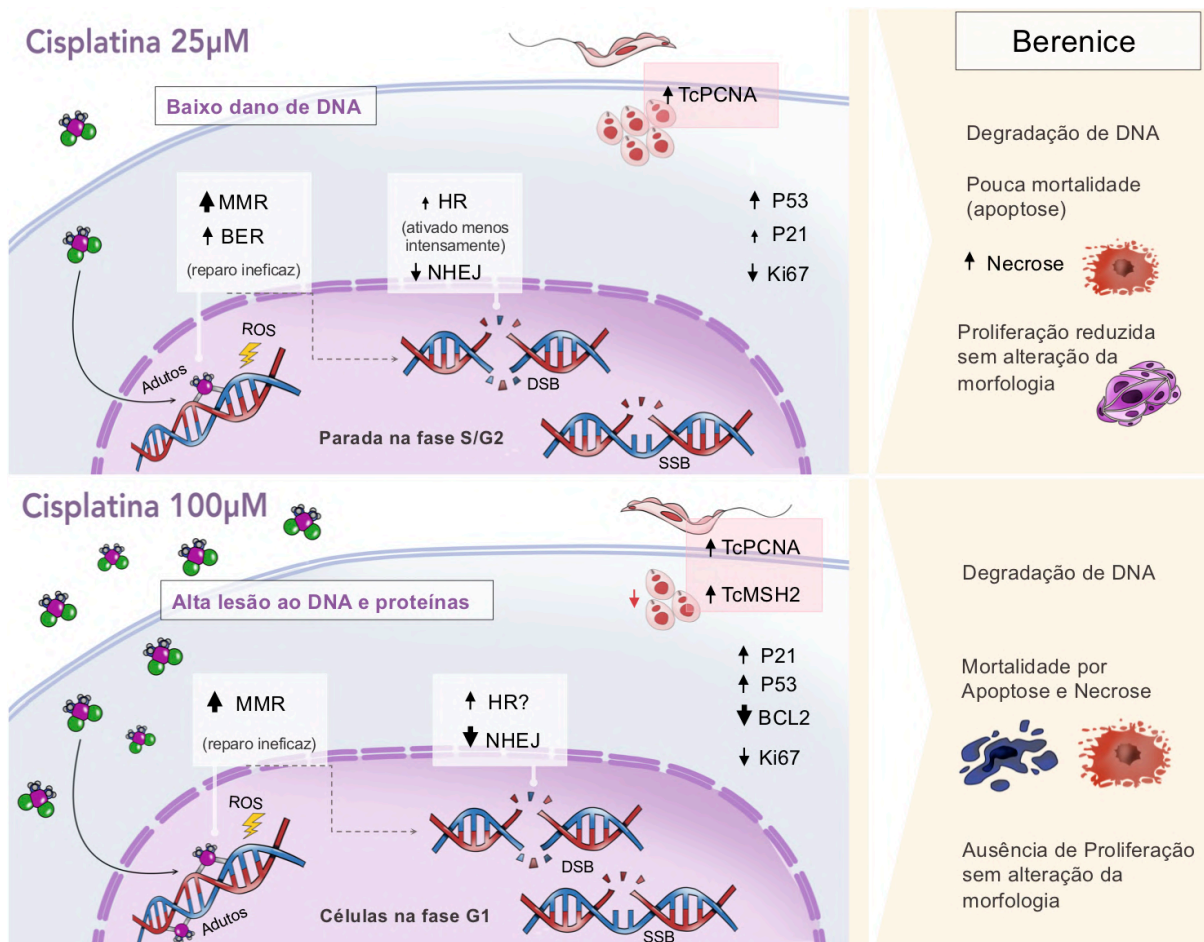


Figura 60. Influência da infecção por *Trypanosoma cruzi* Berenice em culturas L6 tratadas com cisplatina. A infecção pela cepa Berenice influenciou a resposta da célula L6 ao dano por cisplatina. Com tratamento de 25µM, observa-se uma aparente ativação mais acentuada da via MMR e da via BER. Nota-se uma expressão menos significativa dos genes envolvidos com HR, que, embora estejam presentes, estão sendo menos expressos que em células não infectadas. Isso pode explicar a maior degradação de DNA encontrada nestas células e, embora a mortalidade não seja muito proeminente, há maior mortalidade por necrose se comparado com a célula não infectada. Embora tenha redução de *Ki67*, foi possível detectar a presença de alguns poucos grupos de células, sem alteração na morfologia. Embora seja mais expresso, *P21* não foi tão ativado como em células não infectadas, e a expressão de *P53* permaneceu semelhante. Nestas condições, há aumento de expressão de *TcPCNA* pelos parasitos na cultura. No tratamento a 100µM, os genes referentes à HR são todos ativados. No entanto, a não parada do ciclo celular na fase S/G2 põe em dúvida se há mesmo reparo por esta via. Há inativação da via NHEJ. Nessas condições, a infecção continua influenciando no reparo via MMR, que é altamente ativo. Há maior mortalidade, tanto por apoptose como por necrose, e maior degradação de DNA, com expressiva redução de *Bcl2*. Há também expressão aumentada de *P53*. *Ki67* é menos expresso e *P21* mais expresso. No entanto, as células, como as sem infecção, não apresentaram proliferação ou alteração significativa no tamanho celular. Nesta concentração, os parasitos se encontram em menor quantidade dentro das células, e expressam mais *TcPCNA* e *TcMSH2*.

2.4 Influência da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em células L6 tratadas com cisplatina

Ao contrário do que aconteceu com células infectadas com *T. cruzi* Berenice, células infectadas com Colombiana não apresentaram aumento da mortalidade com o tratamento com cisplatina (Figura 15). Isso indica que ou a cepa Berenice promove alterações que leva à mortalidade, ou a cepa Colombiana promove alterações que reduzem a mortalidade de células tratadas com cisplatina, visto que não há diferença de mortalidade entre as cepas em células não tratadas. Chama atenção que, no tratamento com 25 μ M de cisplatina, Colombiana induziu maior mortalidade por necrose que os demais grupos, possivelmente por conta da infectividade da cepa (Figura 16). Assim, o fato de não ter havido mortalidade igual à Berenice indica que a influência das cepas é diferente nas células hospedeiras, o que corrobora com a literatura (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Como em Berenice, houve aumento na expressão de *P53* desde as primeiras 4h pós tratamento, com redução da expressão às 12h, e superexpressão às 24h. Também houve uma redução significativamente maior de *Bcl2* que em células não infectadas (Figura 24). Resultado semelhante ao Sub-G1 foi encontrado no teste do cometa, onde células infectadas com Colombiana não apresentaram maior degradação de DNA que células sem infecção (Figuras 17 e 18). Mesmo com resultados semelhantes aos de células sem infecção no cometa alcalino, o teste do cometa neutro indicou que uma parte da degradação de DNA em células infectadas pela cepa Colombiana e tratadas com cisplatina 100 μ M é de DSB, o que não ocorre em células não infectadas (Figura 19). Visto que os principais genes relacionados com o reparo de DSBs (*Atm*, *Brca1* e *Xrcc4*) encontram-se sub expressos em culturas infectadas com a cepa Colombiana, levanta-se a hipótese de que outra via está ativa para reparar este tipo de lesão. Nota-se um aumento da expressão da transcriptase reversa de L1 em células infectadas com a cepa Colombiana 12h pós-tratamento (Figura 28). A esse respeito, sabe-se que elementos móveis podem participar do reparo do DNA nuclear para garantir a integridade do genoma (SUZUKI *et al.*, 2009; ZINGLER *et al.*, 2005). Células defeituosas em NHEJ, por exemplo, podem usar uma maquinaria alternativa de reparo de DSB mediado por retrotransposição independente de endonuclease (MORRISH *et al.*, 2002; VAISMAN; WOODGATE, 2017).

Ao se observar o perfil de expressão de outros genes de reparo, percebe-se que a cepa Colombiana favorece um perfil de resistência à cisplatina. A infecção por esta cepa induz a expressão precoce de *Pcna*, desde as primeiras 4h do tratamento, e esse gene é significativamente mais expresso em células avaliadas após o período de recuperação (Figura 26 e Figura 27). O PCNA está envolvido numa série de vias de reparo, mas sua expressão está

associada a um perfil de resistência à cisplatina. O tratamento com inibidores de PCNA resulta em apoptose e sensibiliza à cisplatina. O PCNA também é superexpresso em tumores, e, além do reparo, está associado à proliferação (GU *et al.*, 2018; MÜLLER *et al.*, 2013; OLAISEN *et al.*, 2018).

A cepa Colombiana induz também a redução da expressão de *Xrcc1* em células analisadas 24h após o tratamento (Figura 27). *Xrcc1* está envolvido na via BER e não repara eficientemente lesões por cisplatina. A via BER, além de não ser eficaz no reparo a lesões por cisplatina, compete com a via NER, que é eficaz (O'GRADY *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2018). No período de recuperação do tratamento com cisplatina 25µM, há também redução de OGG1, outra enzima da via BER (Figura 26). Testes de correlação entre *Ogg1*, *Xrcc1* (da via BER) e *Xpa* (da via NER) apontam que, durante o período de recuperação, há uma preferência pela ativação da via NER no reparo aos danos por cisplatina (Figura 33). Esses resultados demonstram que a presença da cepa Colombiana promove um direcionamento para o uso de vias de reparo mais eficientes pela célula hospedeira.

A resistência à cisplatina também é vista na expressão de *Msh2*. Como se sabe, a via MMR não é eficaz no reparo a esta droga. Embora durante o tratamento células infectadas com Colombiana apresentem aumento na expressão desse gene, esse aumento é significativamente menor que em células não infectadas, e há redução da expressão às 12h. Independentemente da concentração de cisplatina utilizada, às 24h, células infectadas com Colombiana exibem expressão reduzida de MSH2 (Figuras 26 e 27). Sabe-se que a cepa Colombiana é a que tem a MMR mais eficiente, mas, ainda assim, ela reduz a expressão de MMR da célula. Curiosamente, é neste período que ocorre um aumento na expressão de *TcMSH2* pelos parasitos (mas apenas na concentração de 100µM). É possível, portanto, que a proteína sintetizada pelo parasito atue no reparo celular do hospedeiro, como sugerido por Van Tong *et al* (2017).

A expressão de *Atm* em células infectadas com Colombiana também se diferencia dos demais grupos, pois, no tratamento com cisplatina não há ativação desse gene. Na verdade, às 24h, percebe-se uma redução na expressão, e isso ocorre independentemente da concentração de cisplatina utilizada (Figuras 26 e 27). A não ativação de *Atm* indica que provavelmente a cepa Colombiana não induz o reparo por HR. De fato, às 24h pós tratamento com cisplatina 25µM, a expressão de *Rad51* em células infectadas com Colombiana é semelhante aos níveis basais de expressão, e isso ocorreu apenas neste grupo. Também não há alteração na expressão de *Brcal* em nenhum momento com tratamento com cisplatina. Interessantemente, ATM suprime o reparo da quebra de fita dupla (DSB) do DNA por MMEJ (RAHAL EA *et al.*, 2010).

Assim, a expressão reduzida de *Atm* sugere o funcionamento desta via. Ressalta-se que a cepa Colombiana, assim como Berenice, apresentou DSB pelo ensaio do cometa neutro (Figura 19).

As células tratadas a 25µM de cisplatina apresentam também maior quantidade de células na fase G1, reforçando que não há parada no ciclo celular e, portanto, não há reparo por HR. O acúmulo de células na fase G1 é incomum, já que os efeitos inibitórios da cisplatina nas CDKs da fase G1 é um evento tardio (SIDDIK, 2003). O reparo de DSBs nessa fase é dado principalmente por NHEJ e MMEJ. Nas fases G1 e início da S, DSB complexas são reparadas via MMEJ, enquanto DSB simples são reparada pela NHEJ (TALEEI; NIKJOO, 2013; YUN; HIOM, 2009). Visto que os tripanossomatídeos apresentam como via principal de reparo de DNA o MMEJ (PENG *et al.*, 2015), é possível que moléculas do *T. cruzi* sejam capazes de interagir com proteínas do hospedeiro, alterando o modo de reparo do DNA. Por ter um contato maior e direto com o citoplasma da célula, autores deduzem que o *T. cruzi* influencia a rede molecular do hospedeiro mais diretamente que outros protozoários intracelulares (NAKAJIMA-SHIMADA *et al.*, 2000). Diferente dos outros grupos, apenas células infectadas por Colombiana não apresentam redução na expressão de *Xrcc4* na recuperação do tratamento com cisplatina 25µM (Figura 25). Pode ser que continue então acontecendo o reparo via NHEJ, mas outras vias não podem ser excluídas, como a MMEJ ou a via alternativa de reparo pelo retroelemento L1. Como existe correlação entre *Xrcc4* e *Brcal*, com diminuição na expressão de ambos, é mais provável o reparo mediado por retrotransposon (Figura 32).

Às 24h do tratamento com cisplatina 25µM, células infectadas por Colombiana também exibem redução dos níveis de *P21*, retornando aos níveis basais, e superexpressão de *Ki67*, numa tentativa de incentivar a proliferação celular (Figura 29). Ressalta-se que *Ki67* é utilizado como marcador de proliferação e existem evidências de que sua expressão reflita a taxa de proliferação tumoral, estando correlacionada com iniciação, progressão, metástase e prognose de uma série de tumores (LI *et al.*, 2015). Este dado reafirma o perfil de resistência à cisplatina em células infectadas com a cepa Colombiana. No entanto, no ensaio do cristal violeta, não houve formação de colônias, e as células apresentaram características morfológicas de células senescentes, com aparência alargada. De forma contraditória também, há maior expressão de *P16* nestas células, um marcador de senescência (Figura 29). Assim, este é um resultado não esperado, que poderia ser explicado pela participação de moléculas originárias do parasito que estimulariam a expressão de *Ki67*, visando garantir a perpetuação de seu hospedeiro e, conseqüentemente, sua sobrevivência. Entretanto, mais experimentos são necessários para validar essa hipótese.

Ressalta-se que, no tratamento mais intenso de cisplatina (100 μ M), apenas as células infectadas com Colombiana apresentaram maior quantidade de células na fase S/G2 imediatamente após o tratamento, mas nas 24h, não houve diferença significativa entre os outros grupos (Figura 23). Tanto no controle como em células infectadas com Berenice, no tratamento mais intenso não há parada na fase S/G2, provavelmente por conta da alta dose de cisplatina, que impede a ativação do reparo celular por HR e ativa as vias de morte celular. Em Colombiana, no entanto, não há alteração molecular que indique que o reparo estaria ocorrendo via HR, e nem parada no ciclo nas horas de recuperação. Assim, esse aumento de células na fase S/G2 apenas imediatamente após o tratamento pode indicar que as células estariam ainda se proliferando mesmo em meio ao tratamento intenso de cisplatina, reafirmando um perfil de resistência à droga. Corroborando com o aumento na proporção de células na fase S/G2, não há correlação entre as expressões de *Atm*, *P53* e *P21* em Colombiana (Figura 34). Nessas condições, também não há diferenças na expressão de *Ki67* ou *P21* com relação à célula sem infecção, mas há aumento na expressão de *P16* às 24h pós tratamento (Figura 29), indicando que as células que sobreviveram provavelmente entrarão num estado de senescência.

O resumo dos eventos observados em células L6 com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com cisplatina está representado na Figura 61.

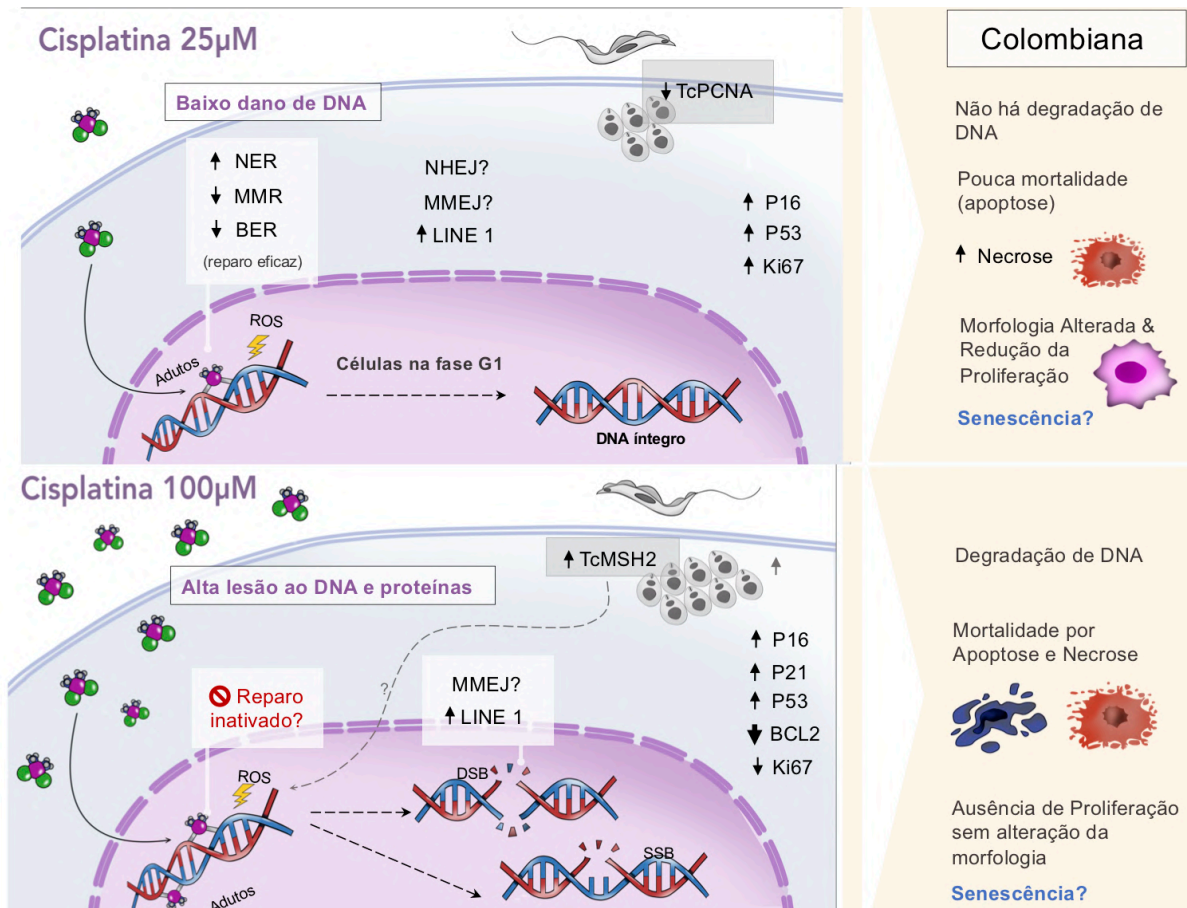


Figura 61. Influência da infecção por *Trypanosoma cruzi* Colombiana no tratamento com cisplatina. A infecção por Colombiana parece induzir um perfil de resistência à cisplatina pelas células L6. A infecção por Colombiana parece reduzir a expressão de genes de reparo via MMR e via BER, que são reparos ineficientes para cisplatina. Ao mesmo tempo, parece ocorrer ativação da expressão de genes da via NER, uma via de reparo eficaz. A via HR não parece estar sendo ativada. A parada na fase G1, no tratamento a 25µM, indica que o reparo de DSB pode estar ocorrendo via NHEJ, MMEJ ou via alternativa por LINE-1. A 25mM, células infectadas apresentaram baixa taxa de mortalidade, com maior mortalidade relativa por necrose, talvez, pela própria infecção ou pela não ativação de vias apoptóticas, já que não há alteração de *Bcl2*. Interessantemente, apesar do aumento da expressão de *Ki67*, há aumento na expressão de *P16* e *P53*, que, juntamente com morfologia alterada e redução da proliferação, sugere senescência. Nessas condições, há redução na expressão de *TcPCNA* do parasito. No tratamento a 100µM, o reparo das lesões por cisplatina parece estar inativado, assim como em células não infectadas. Há, entretanto, sugestão de ativação da via MMEJ e de reparo pela via alternativa de LINE-1, o que reduziria apenas parcialmente o nível de quebra de dupla fita (DSB). Nessa condição, não há proliferação celular e há maior mortalidade por apoptose e necrose, com redução expressiva de *BCL2*, aumento na expressão de *P16*, *P21* e *P53* e redução de *Ki67*, o que molecularmente sugere senescência, apesar de morfologicamente não ter sido encontrada grande alteração nas células. Os parasitos aparecem em maior quantidade, com maior expressão de *TcMSH2*. Sugere-se que esta proteína poderia estar interferindo no reparo do hospedeiro.

3 Tratamento com Peróxido de Hidrogênio

3.1 Efeito do peróxido de hidrogênio na célula L6

A degradação de DNA encontrada desde as primeiras 4h de dano (Figura 44) é explicada pelo mecanismo de ação de H_2O_2 , que provoca SSB e DSB por meio da geração de radicais OH, ao reagir com íons ferro no citoplasma (FRANKENBERG-SCHWAGER *et al.*, 2008). Desta forma, a DSB não surge apenas durante parada na forquilha de replicação, mas o próprio tratamento é gerador de DSB, sendo, portanto, perceptível a degradação de DNA desde o início do tratamento e em doses mais baixas de H_2O_2 . Isto explica porque praticamente toda a degradação de DNA detectada no teste do cometa se trata de DSB, considerando-se o teste do cometa neutro (Figura 44D) A mortalidade, no entanto, só é perceptível nas 24h após o início do tratamento (Figura 38), indicando que há necessidade de um acúmulo de danos do tipo 8-oxoG para que haja disfunção mitocondrial e morte celular, programada ou não (SIES, 2017; SIES; BERNDT; JONES, 2017; VAN HOUTEN; WOSHNER; SANTOS, 2006a, 2006b).

Nossos resultados mostraram que a maior parte das células permaneceram na fase G1 (Figura 47 e Figura 48). A esse respeito, sabe-se que enquanto altos níveis de H_2O_2 induzem apoptose, concentrações moderadas coordenam um conjunto de eventos moleculares que levam à parada no ponto G1/S do ciclo celular (DESHPANDE *et al.*, 2002). Portanto, a depender da concentração utilizada, o H_2O_2 pode desencadear uma série de respostas celulares de reparo de DNA, pode parar o ciclo celular ou pode desencadear a apoptose.

Enquanto no tratamento com H_2O_2 0,8mM a degradação de DNA aumenta às 4h e se mantém relativamente estável ao longo do tempo, com H_2O_2 1,6mM há um aumento progressivo da degradação, com aparente recuperação às 24h (Figura 43). Essa diferença pode ser explicada pela maior expressão de genes de diferentes vias de reparo logo no começo do tratamento com H_2O_2 0,8mM, o que não é observado no tratamento com 1,6 mM. Nesta última concentração, observa-se uma expressão importante de *Pcna* a partir de 12h, o que pode justificar a recuperação desse grupo às 24h, ainda que se observe uma significativa taxa de mortalidade nesse período.

O teste de anexina/PI mostrou que o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio aumenta a mortalidade por necrose, apoptose e apoptose tardia, com maior parte das células morrendo por apoptose, confirmando que o tratamento com H_2O_2 leva à mortalidade celular de diferentes maneiras (VILEMA-ENRÍQUEZ *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstraram que houve redução na expressão de *Bcl2* apenas a 0,8mM (Figura 49). Sabe-se que o tratamento com peróxido efetivamente reduz a expressão da proteína antiapoptótica

BCL2, que leva a um aumento na expressão da proteína pró-apoptótica BAX e a um aumento da liberação de citocromo C da mitocôndria (VILEMA-ENRÍQUEZ *et al.*, 2016). Também se observou aumento na expressão de *P53* nas primeiras horas, sendo que, com o tratamento menos intenso (0,8mM), a expressão de *P53* é maior que em 1,6mM. Provavelmente a 0,8mM, esta proteína está envolvida também no reparo celular e controle do ciclo celular, juntamente com a *P21*.

Esses achados corroboram com o que já foi descrito na literatura, onde o tratamento com menores concentrações de H₂O₂ leva à ativação da apoptose, enquanto o tratamento com concentrações mais elevadas não (HAMPTON; ORRENIUS, 1997; TROYANO *et al.*, 2003). Isso pode ser explicado pelo fato de a oxidação excessiva poder suprimir a apoptose pela inativação direta de caspases (SAMALI *et al.*, 1999), porém outros mecanismos também podem estar envolvidos. Por exemplo, a ausência de histonas protetivas no DNA mitocondrial o torna mais suscetível que o DNA nuclear ao dano por peróxido (YAKES; VAN HOUTEN, 1997). Assim, na concentração menor de H₂O₂ (0,8mM), o DNA mitocondrial está sendo afetado, porém o DNA nuclear, que codifica todos os genes das vias de reparo e de apoptose, ainda está preservado, permitindo a ativação desses genes. Já com 1,6mM, o DNA nuclear também começa a ser danificado, necessitando de um período de recuperação para retomar sua funcionalidade (VAN HOUTEN; WOSHNER; SANTOS, 2006b; YAKES; VAN HOUTEN, 1997). Por isso observamos um aumento de degradação e posterior recuperação, que parece ser mediada pela expressão de *Pcna*. De interesse, BCL2 se liga a APE1 mitocondrial, impedindo a ativação de PCNA nessa organela, mas não no núcleo (XIE; DOETSCH; DENG, 2015). Como a 0,8mM tivemos diminuição da expressão de *Bcl2*, isso possibilitou o reparo do mtDNA pela via BER, modulando o processo de apoptose (VILEMA-ENRÍQUEZ *et al.*, 2016).

Ademais, é relatado que, nesse processo, ocorre a ativação da ATM, parada no ciclo nas fase G2-M ou G1-S e aumento nos níveis de *P53* e *P21* (VILEMA-ENRÍQUEZ *et al.*, 2016). Em nosso estudo, no tratamento de células L6 com 0,8mM de H₂O₂, foi possível observar aumento na expressão de *Atm* até as 12h (Figura 50 e Figura 51), junto com um aumento na expressão de *P53* e *P21* (Figura 55). Também se observa o aumento da expressão de *Rad51* até as 12h e maior expressão de *Brca1* às 4h (Figura 51), o que sugere que provavelmente está ocorrendo reparo via HR, por conta das degradação de DNA detectadas desde às 4h. Ressalta-se que o reparo de DSB é essencial para superar lesões por peróxido de hidrogênio e HR é importante para recuperar de dano oxidativo (HAYASHI; UMEZU, 2017; SHARMA *et al.*, 2016).

Entretanto, é possível que outros tipos de reparo de DSB também estejam ocorrendo, como NHEJ. Sabe-se que, na fase S, tanto HR como NHEJ são importantes, mas NHEJ é essencial para reparo de DSBs que ocorrem na fase G1 (FRANKENBERG-SCHWAGER *et al.*, 2008). Apesar de não haver alteração significativa ao longo do tempo na expressão de *Xrcc4*, em células sem infecção há maior expressão deste gene em relação a células infectadas, no tratamento a 0,8mM (Figura 51), indicando que o reparo via NHEJ está ativo.

Imediatamente após tratamento com H₂O₂ 0,8mM, há aumento da expressão dos genes *Ogg1* e *Xrcc1*, da via BER, e de *Msh2*, da via MMR. Nesta condição, existe de fato correlação na expressão entre os genes da via BER e da via MMR, sugerindo que as duas estão ativadas (Figura 54). É interessante ressaltar que alguns autores já sugeriram o papel de *Msh2* na via BER de lesões oxidativas, principalmente as que provocam parada na maquinaria de transcrição (YANAMADALA; LJUNGMAN, 2003). Não há correlação com a expressão de *Xpa*, um gene da via NER, que não é alterado ao longo do tempo do tratamento com H₂O₂. Isso se deve ao fato de o peróxido produzir principalmente lesões de oxidação de bases, e poucas lesões de adutos de DNA, havendo, portanto, uma preferência pela via BER (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

O tratamento levou a uma progressiva redução da proliferação celular, linear com o aumento da concentração (Figura 45). A morfologia celular também mudou de maneira linear, aumentando o diâmetro de Feret juntamente com a concentração de H₂O₂. Isso indica que, provavelmente, o peróxido de hidrogênio esteja induzindo um aspecto de senescência das células tratadas, justificando a redução da proliferação. Em acordo, existe redução significativa na expressão de *Ki67* e aumento na expressão de *P21* com o tratamento com H₂O₂, independentemente da concentração (Figura 52). Como já descrito, com o aumento da concentração, nota-se uma tendência de aumentar a proporção de células na fase G1, imediatamente após o tratamento (Figura 46). Isso pode indicar uma menor proliferação celular e indução de senescência, o que corrobora com a literatura (SAXENA *et al.*, 2019). Paradoxalmente, a expressão de *P16*, um agente central na indução de senescência celular (CERELLA *et al.*, 2016), não alterou significativamente ao longo do tempo (Figura 52).

A Figura 62 resume o mecanismo de reparo ao dano de DNA decorrente da ação do peróxido de hidrogênio em células L6.

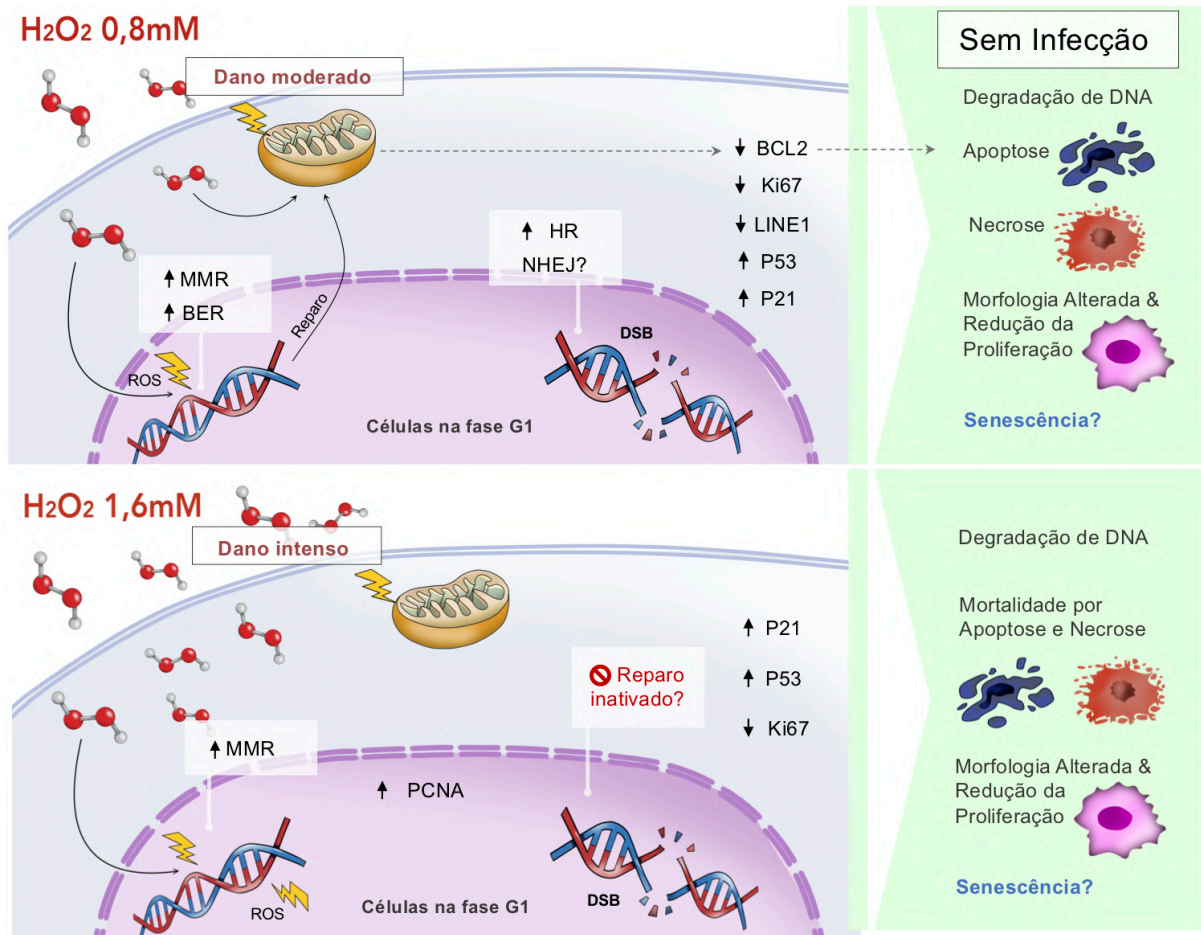


Figura 62. Reparo de DNA de célula L6 sob tratamento com H₂O₂. O tratamento com H₂O₂ 0,8mM provocou danos moderados na célula L6, com degradação de DNA desde as primeiras horas do tratamento. Provavelmente, por ser mais sensível que o DNA nuclear, o DNA mitocondrial sofreu sérios danos com a exposição ao H₂O₂. Vias de reparo no núcleo tiveram expressão ativada, principalmente MMR, BER, HR e, talvez, NHEJ, que também influenciariam o reparo na mitocôndria, que por sua vez levaria à ativação da cascata apoptótica, observada pela redução de *Bcl2*. Molecularmente e morfológicamente, a senescência parece estar sendo ativada em algumas células tratadas. O tratamento com H₂O₂ 1,6mM provocou danos extensos ao DNA e proteínas, inativando parcialmente o reparo no núcleo. Apenas a via MMR, e a proteína PCNA, apareceram com expressão ativada. Isto resultou em maior mortalidade, mas não necessariamente via apoptose. Há também algumas características de senescência na cultura.

3.2 Influência do peróxido de hidrogênio no *Trypanosoma cruzi*

O H₂O₂ possui um papel dubio na biologia do *T. cruzi*, não apenas promovendo mortalidade, mas atuando também como sinalizador celular e indutor da proliferação (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014; ROSE; CARVALHO; HECHT, 2020). O tratamento com peróxido de hidrogênio indicou que os parasitos são tanto quanto ou mais sensíveis ao H₂O₂ que as células L6, apresentando uma taxa de cerca de 40% de mortalidade após o período de recuperação (Figura 56). Embora a literatura apresente maior sensibilidade a

H₂O₂ por parte da cepa Berenice, em comparação com a Colombiana, devido aos diferentes isotipos de TcMSH2 (CAMPOS *et al.*, 2011b), não identificamos diferença significativa entre as cepas em nossos experimentos. Destaca-se a mudança na forma do epimastigota após o tratamento, que adquiriu formato arredondado, com maior incidência principalmente após o período de recuperação de 24h. Sabe-se que os esferomastigotas se desenvolvem em condições de estresse no ciclo de vida do parasito, como o estresse oxidativo (MELO; GUARNERI; SILBER, 2020). Isso confirma que o tratamento com H₂O₂ provocou estresse nos parasitos, e, provavelmente, ativou suas vias de reparo.

Corroborando com o resultado da taxa de mortalidade, se verificou uma redução no número absoluto de parasitos da cepa Berenice após o tratamento com H₂O₂ 1,6mM de células infectadas (Figura 57). O mesmo não ocorre no tratamento mais leve, de 0,8mM. Após o período de recuperação (24h), a proporção de parasitos Berenice em células L6 aumenta significativamente, sugerindo que o parasito é capaz de se recuperar e restabelecer o processo de multiplicação. De fato, a partir das 12h, há aumento na expressão de *TcPCNA* e *TcMSH2* de *T. cruzi* Berenice, sendo que *TcPCNA* permanece mais expresso até às 24h. No tratamento mais brando, de 0,8mM, há aumento de *TcPCNA* desde às 4h do tratamento, e não há alteração de *TcMSH2*.

Interessantemente, não há alteração na quantidade de parasitos da cepa Colombiana no tratamento com H₂O₂ em nenhuma condição de tratamento, indicando a maior resistência desta cepa a esse tipo de dano (CAMPOS *et al.*, 2011b). Só houve alteração na expressão de genes de reparo no tratamento de 1,6mM, com aumento de *TcMSH2* e *TcPCNA* no período de 12h de recuperação, especificamente às 12h.

3.3 Influência da cepa Berenice de *Trypanosoma cruzi* em células L6 tratadas com peróxido de hidrogênio

A infecção pela cepa Berenice provocou uma maior mortalidade de células L6 no tratamento com H₂O₂ 0,8mM, evidente no ponto de 24h pós início do tratamento (Figura 39). No tratamento a 1,6mM, no entanto, ainda que tenha ocorrido um aumento geral, a mortalidade é significativamente menor em células não infectadas (Figura 41). Há aumento de necrose, apoptose e apoptose tardia com o aumento da concentração de H₂O₂, e a infecção induziu mais apoptose no início da recuperação, o que fica evidente pela maior proporção de apoptose tardia em células infectadas com *T. cruzi* (Figura 42). Logo após o tratamento (4h), células infectadas com *T. cruzi* Berenice apresentam uma menor ativação de *P53*. No entanto, a infecção por esta cepa resulta em aumento na expressão deste gene nas horas seguintes ao tratamento, o que não

ocorre nos outros grupos. A cepa Berenice também reduz a expressão de *Bcl2* em células tratadas, o que não ocorre nos outros grupos (Figura 49). Isso explica o aumento na mortalidade.

A degradação de DNA das células L6 aumenta desde às primeiras 4h. Neste momento, há menor degradação de DNA de células infectadas com Berenice do que células não infectadas, no tratamento com 1,6mM (FigurasFigura 43 e Figura 44). Ao longo do período de recuperação, no entanto, não há diferença na degradação de DNA. Assim como em células não infectadas, em células infectadas com *T. cruzi* Berenice, após tratamento com H₂O₂ 1,6mM, praticamente todo o DNA degradado se trata de DSB (Figura 44). Entretanto, percebe-se uma ativação da expressão das proteínas da via HR (ATM, RAD51 e BRCA1) de forma menos intensa que em células sem infecção (Figura 51). Também não há alteração na expressão de *Xrcc4*, proteína da via NHEJ (Figura 50). Igualmente, embora ocorra aumento de expressão de *Msh2* e *Pcna*, a infecção pela cepa Berenice faz que este aumento seja menos pronunciado que em células não infectadas. Assim, a presença deste parasito parece prejudicar a capacidade da célula de se recuperar do dano causado pelo estresse oxidativo.

Aumento de expressão inicial de *Xrcc1*, às 4h de tratamento, e de *Ogg1* (Figura 51) em células infectadas com a cepa Berenice sugere que, mesmo na presença do parasito, houve uma ativação da via BER, essencial no reparo de lesões por H₂O₂, como oxidação de bases, desde o início do tratamento. Em todos os tempos analisados, apenas a infecção por Berenice provoca redução na expressão de *Xpa*, à medida que a concentração de H₂O₂ aumenta. Testes de correlação indicam uma relação inversamente proporcional entre a expressão do gene *Xpa* da via NER e do gene *Ogg1* da via BER, indicando que o reparo está sendo feito preferencialmente pela via BER, em detrimento da NER, e em conjunto com a via MMR, devido à correlação com *Msh2* (Figura 54).

A Figura 63 apresenta um resumo dos mecanismos de reparo ao dano de DNA decorrente da ação do peróxido de hidrogênio em células L6 infectadas com *T. cruzi* Berenice.

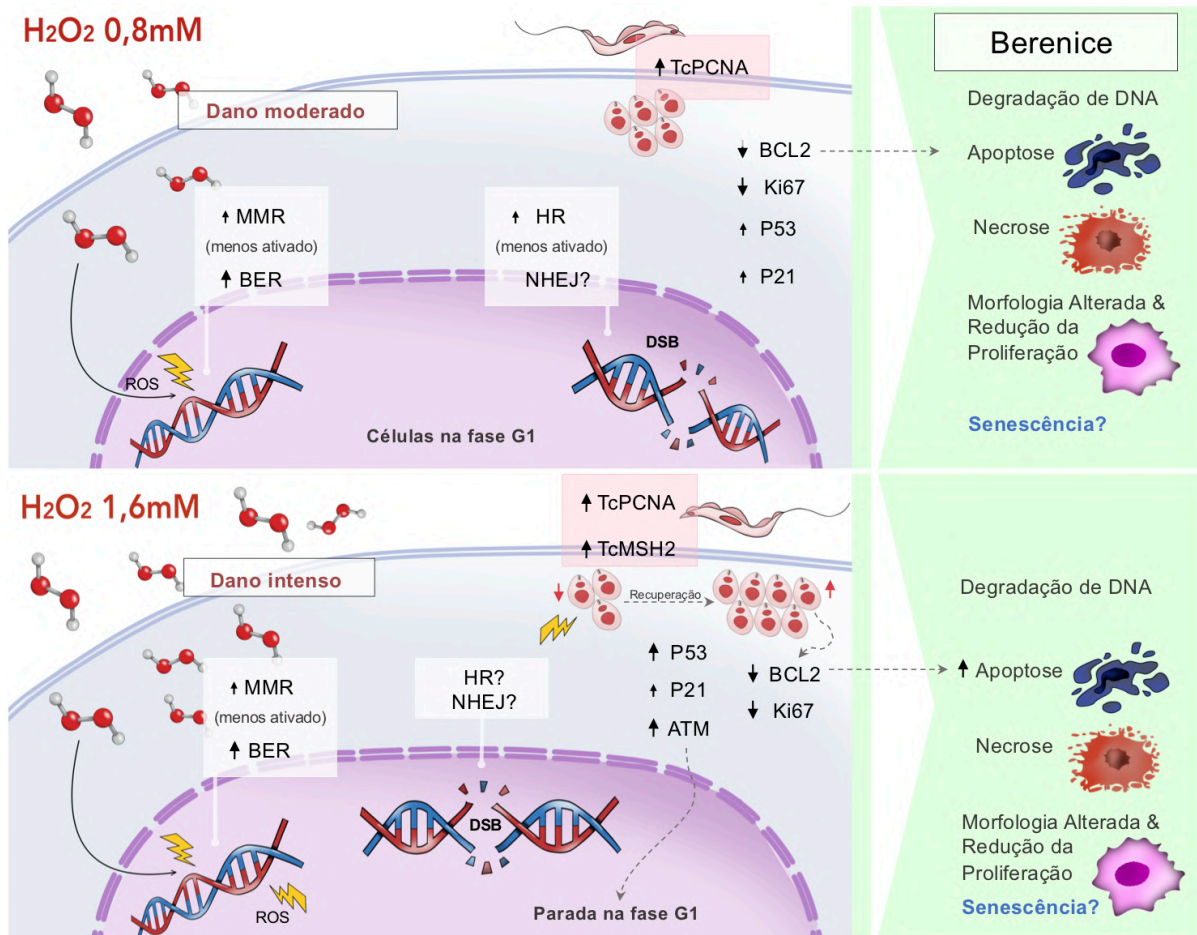


Figura 63. Influência de *Trypanosoma cruzi* Berenice sobre células L6 no tratamento com H₂O₂. O tratamento com H₂O₂ 0,8mM levou a danos moderados na célula, resultando em degradação de DNA. A infecção pela cepa Berenice parece influenciar na resposta ao dano, com a expressão de genes da via MMR e via HR menos ativas que em células sem infecção. Nesta concentração, foi detectada ativação apenas da expressão de *TcPCNA* no parasito. A via apoptótica está ativa, e as células apresentam características de senescência. O tratamento mais intenso, a 1,6mM, parece ter afetado bastante a cepa Berenice, visto uma redução inicial no número de parasitos, que expressam mais ativamente *TcPCNA* e *TcMSH2*. Os parasitos, no entanto, parecem se recuperar bem da lesão, já que, às 24h, a parasitemia aparece maior. A infecção por Berenice também influencia no reparo da célula L6, no tratamento mais intenso. Há ativação de expressão de genes das vias BER e MMR, e provavelmente de HR ou NHEJ. Também há ativação da apoptose, com redução de *Bcl2* e maior quantidade de células em apoptose tardia. Verificou-se também aspectos de células senescentes.

3.4 Influência da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em células L6 tratadas com peróxido de hidrogênio

Com o aumento da concentração de H₂O₂, células infectadas com a cepa Colombiana apresentaram significativamente menos mortalidade que os demais grupos às 24h pós início do tratamento (Figura 39). O teste de anexina/PI mostrou que, no tratamento de 0,8mM, células infectadas por Colombiana morrem significativamente menos por necrose (Figura 42). Há

aumento na expressão de *P53* e redução na expressão de *Bcl2* apenas no tratamento com H₂O₂ 0,8mM (Figura 49). Esses resultados reforçam o que foi visto para as células não infectadas e relatado na literatura, isto é, menores concentrações de H₂O₂ levam à ativação da apoptose, enquanto concentrações mais elevadas não (HAMPTON; ORRENIUS, 1997; TROYANO *et al.*, 2003).

A degradação do DNA também foi menor em células infectadas com Colombiana, e essa degradação diminuiu com o aumento da concentração de H₂O₂ (Figura 43 e Figura 44). O teste do cometa neutro mostra que, diferente dos outros grupos, células infectadas com Colombiana apresentam mais da metade da degradação de DNA como SSB, e não DSB. Sabe-se que ATM e XRCC1 estão envolvidos no reparo de SSB e prevenção de DSB (CALDECOTT, 2019; KHORONENKOVA; DIANOV, 2015). A análise da expressão dos genes de reparo da célula hospedeira, no entanto, não esclarece a redução de DSBs. Assim, uma possível explicação é que proteínas secretadas pelo parasito estejam atuando diretamente no reparo do DNA célula L6, como já sugerido por Van Tong *et al* (2017). De interesse, foi identificado TcPCNA no secretoma do *T. cruzi* (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; QUEIROZ *et al.*, 2016).

Essa hipótese ganha maior credibilidade ao verificarmos que o aumento da concentração de peróxido não exerce alteração significativa na expressão de *Msh2* em células infectadas com Colombiana (Figura 51). Interessantemente, esta cepa é a que tem o isotipo desta proteína mais eficaz (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003) e vimos que o parasito aumenta a expressão de TcMSH2 na recuperação do tratamento com H₂O₂ (Figura 58). Assim, a possibilidade levantada por Van Tong *et al* (2017) parece fazer sentido.

As células infectadas pela cepa Colombiana apresentam a maior expressão de *Pcna* às 4h do tratamento entre todos os grupos. Outra proteína da via BER, XRCC1, se encontra mais expressa às 4h de tratamento. Igualmente, apenas células infectadas por esta cepa apresentam aumento na expressão de *Rpal* às 4h do tratamento, um gene da via NER. Não há, no entanto, alteração significativa de *Xpa*, um gene chave da NER, e nem alteração significativa na expressão de *Ogg1*, gene chave no reparo de dano oxidativo via BER (Figura 50). Como esses genes codificam proteínas que atuam nas etapas iniciais dessas vias (ABBOTTS; WILSON, 2017; FOSTERI; MULLENDERS, 2008), é provável que eles tenham tido suas expressões aumentadas antes do período de 4h que foi avaliado.

Embora *Rad51* tenha expressão aumentada nos tempos de 4h e 12h, indicando reparo via HR, *Brcal* é menos expresso que em células não infectadas (Figura 51). Há aumento na expressão de ATM às 12h. Não há alteração na expressão de *Xrcc4*, sugerindo uma não preferência pela via NHEJ, fato que também foi observado nas culturas infectadas com a cepa

Berenice. Vale lembrar que apenas poucos fatores (Mre11, Ku70/Ku80 e APTX) da via NHEJ estão presentes no *T. cruzi* (GENOIS *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2015). Assim é possível que esse parasito expresse alguma proteína que interaja com proteínas de NHEJ, inibindo-a, o que pode ter levado ao desaparecimento de determinados genes e na inativação da via neste grupo.

Embora não haja alteração no número de colônias e morfologia celular, culturas infectadas por Colombiana têm mais células na fase S/G2 às 24h de tratamento que as demais, o que pode ser um indicativo de que elas se recuperaram mais rapidamente. Mesmo assim, a proporção não ultrapassou 50% (Figura 46 e Figura 48).

A Figura 64 apresenta um modelo dos possíveis mecanismos de reparo ocorridos em células L6 infectadas com *T. cruzi* Colombiana e tratadas com H₂O₂.

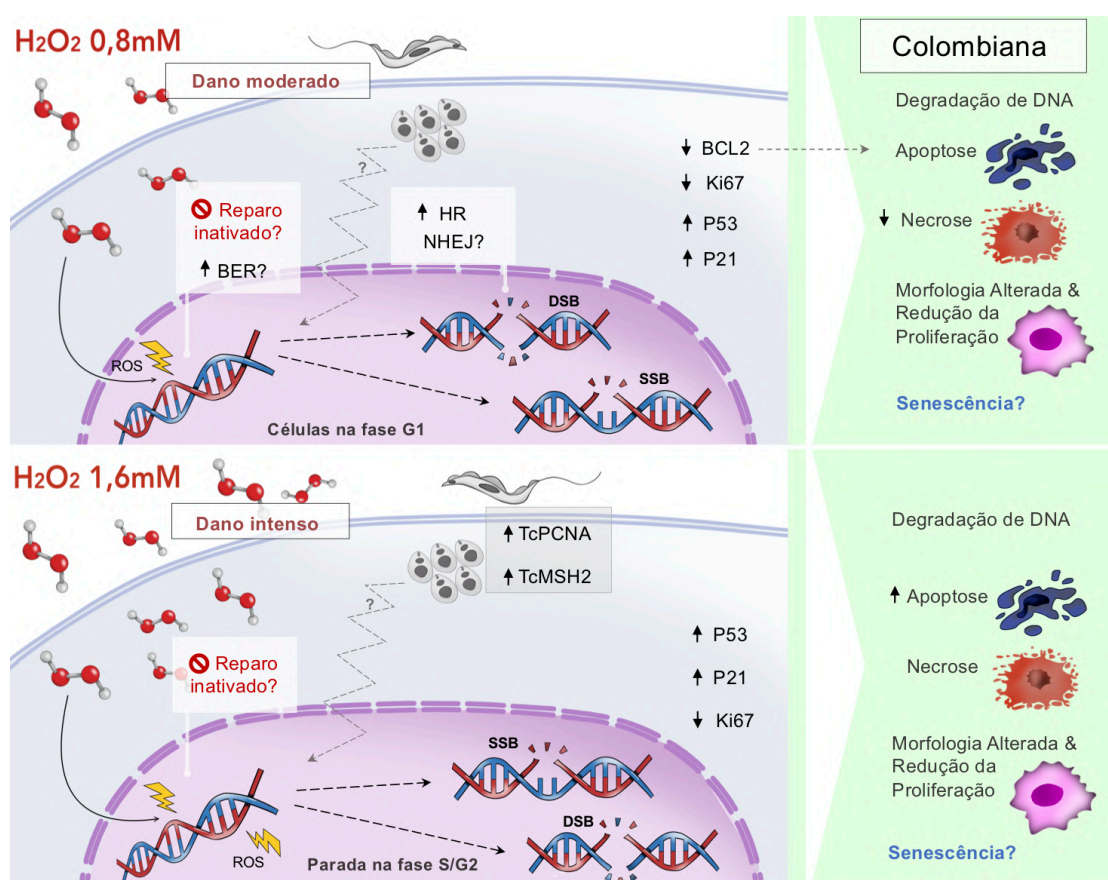


Figura 64. Influência de *Trypanosoma cruzi* Colombiana sobre células L6 no tratamento com H₂O₂. O tratamento com H₂O₂ 0,8mM provoca danos moderados à célula L6. A infecção por Colombiana, no entanto, parece diminuir a resposta ao dano na célula, com ativação da expressão de apenas um gene da via BER, *Xrcc1*. Isso talvez explique a maior quantidade de DNA com quebra de simples fita, por não haver um reparo eficaz. Curiosamente, células infectadas com Colombiana apresentam menor mortalidade por necrose. No dano mais intenso, o reparo da célula parece continuar inativado, e apenas o reparo do parasito está funcionando, com ativação da expressão de *TcPCNA* e *TcMSH2*. Como não há aumento na mortalidade celular ou na degradação de DNA, é possível que o parasito influencie no reparo da célula, em ambas as concentrações. As células também apresentam um perfil de senescência.

VII. Conclusão

Os resultados deste trabalho mostram que:

- A infecção por *T. cruzi* leva a um aumento significativo da mortalidade de células L6, porém sem causar aumento de degradação do DNA, alteração do ciclo celular ou alteração da expressão significativa de genes relacionados à mortalidade celular, reparo de DNA, proliferação, senescência e retrotransposição;
- Células infectadas com *T. cruzi* Colombiana tiveram uma proliferação significativamente menor;
- A infecção por *Trypanosoma cruzi* afeta o ciclo celular e a resposta ao dano ao DNA de miócitos L6 sujeitos a diferentes tratamentos mutagênicos: cisplatina, e H₂O₂, Essas alterações dependem da cepa do parasito;
- A infecção pela cepa Berenice resulta em maior degradação de DNA, mesmo em menores concentrações de cisplatina, enquanto a infecção pela cepa Colombiana reduz a incidência de DSBs no tratamento com H₂O₂;
- No tratamento com H₂O₂, células infectadas com a cepa Berenice tiveram uma menor ativação das vias de reparo, em comparação com o controle. De maneira distinta, células infectadas pela cepa Colombiana desenvolveram um perfil de resistência a cisplatina;
- Células infectadas pela cepa Berenice apresentam maior proliferação e menor tamanho celular, enquanto a infecção por Colombiana aumenta a expressão de genes indutores de senescência, cujas células apresentaram menor proliferação e maior tamanho celular, no tratamento com cisplatina.

VIII. Perspectivas

Há anos o *T. cruzi* tem se revelado um parasito com muitas peculiaridades quanto sua biologia e sua relação com o hospedeiro. Até hoje, mais de 110 anos após a descoberta da doença de Chagas, muito há para se esclarecer quanto ao desenvolvimento da patologia (ANDRADE; ANDREWS, 2005). Diversas evidências sobre reprogramações genéticas e metabólicas já foram relatadas em células infectadas por *T. cruzi* (CHIRIBAO *et al.*, 2014; REPOLÊS; MACHADO; FLORENTINO, 2020; WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016). Assim, este trabalho apresenta descobertas que podem ter diversas implicações na compreensão da relação parasito-hospedeiro e no desenvolvimento da doença de Chagas. Ao modular o metabolismo de células hospedeiras em estresse, o parasito irá influenciar a progressão da própria doença de Chagas, bem como de outras patologias.

Diversas evidências sugerem que a infecção por *T. cruzi* pode estar associada ao desenvolvimento ou à proteção do câncer, a depender da cepa e do tipo de tecido (DARANI *et al.*, 2009; KALLINIKOVA *et al.*, 2001; MUNARI *et al.*, 2018; MURTA *et al.*, 2002; RAMIREZ-TOLOZA *et al.*, 2015; UBILLOS *et al.*, 2016). O reparo de DNA exerce um papel central em vários processos biológicos ligados ao surgimento de tumores. Disfunções nas vias *checkpoints* e a deficiência no reparo ao DNA aumentam a instabilidade do genoma e desencadeiam a patogênese de células malignas (BASU, 2018; CHOI; KYOUNG JOO; HWA JEON, 2016; MOUW, 2017).

Ainda há muito para ser explorado, mas os resultados obtidos neste trabalho mostram que a infecção por *T. cruzi* é capaz de modular a resposta de diferentes tipos de dano de DNA. É possível que esta modulação da resposta ao dano de DNA esteja envolvida no papel de desenvolvimento ou prevenção ao câncer do *T. cruzi*. Este trabalho, portanto, mostra a complexidade da relação parasito-hospedeiro, e da influência do parasito na sobrevivência da célula infectada, que abrange todo o metabolismo celular, inclusive o metabolismo de DNA. A partir destas informações, é possível abrir novos caminhos de investigação em diferentes áreas biológicas e da saúde, tanto na dinâmica e patologia da Doença de Chagas, como em investigações em pesquisa sobre câncer, e melhor compreensão da biologia do *T. cruzi*.

IX. Referências Bibliográficas

ABBOTTS, Rachel; WILSON, David M. **Coordination of DNA single strand break repair.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039>

ALDASORO, E. *et al.* What to expect and when: Benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx516>

ANDRADE, Luciana O. *et al.* **Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice** *Molecular and Biochemical Parasitology*. [S. l.: s. n.].

ANDRADE, Luciana O. *et al.* Differential tissue tropism of Trypanosoma cruzi strains: an in vitro study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 105, n. 6, p. 834–837, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000600018>

ANDRADE, Luciana O.; ANDREWS, Norma W. Opinion: The Trypanosoma cruzi - Host-cell interplay: Location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 819–823, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>

APARICIO, Tomas; BAER, Richard; GAUTIER, Jean. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. **DNA Repair**, [S. l.], v. 19, p. 169–175, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.014>

AUBREY, Brandon J. *et al.* How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 104–113, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>

AUGUSTO-PINTO, Luiz *et al.* Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the Trypanosoma cruzi. **Gene**, [S. l.], v. 272, p. 323–333, 2001.

AUGUSTO-PINTO, Luiz *et al.* Single-nucleotide polymorphisms of the Trypanosoma cruzi MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**, [S. l.], v. 164, n. 1, p. 117–126, 2003.

BASU, Ashis K. **DNA damage, mutagenesis and cancer.** [S. l.]: MDPI AG, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>

BAYER-SANTOS, Ethel *et al.* Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr300947g>

BERGHE, Tom Vanden *et al.* **Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm3737>

BHATTACHARYYA, A. *et al.* Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, [*S. l.*], v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>

BONNEY, Kevin M.; ENGMAN, David M. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? Chagas Heart Disease. **Curr Mol Med**, [*S. l.*], v. 8, p. 510–518, 2008.

BRIDGE, Gemma; RASHID, Sukaina; MARTIN, Sarah A. DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: Implications for cancer biology and treatment. **Cancers**, [*S. l.*], v. 6, n. 3, p. 1597–1614, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers6031597>

CABRERA, G. *et al.* DNA repair BER pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Biochemistry**, [*S. l.*], v. 112, n. 8, p. 2189–2199, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.23138>

CALCINOTTO, Arianna *et al.* CELLULAR SENEESCENCE: AGING, CANCER, AND INJURY. **Physiol Rev**, [*S. l.*], v. 99, n. 2, p. 1047–1078, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>

CALDECOTT, Keith W. **XRCC1 protein; Form and function.** [*S. l.*]: Elsevier B.V., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102664>

CAMPISI, Judith. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annual Review of Physiology**, [*S. l.*], v. 75, n. 1, p. 685–705, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>

CAMPOS, Priscila C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*S. l.*], v. 176, n. 1, p. 8–16, 2011 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.001>

CAMPOS, Priscila C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*S. l.*], v. 176, n. 1, p. 8–16, 2011 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.001>

CERELLA, Claudia *et al.* Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Current Drug Targets**, [*S. l.*], v. 17, p. 405–415, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389450116666150202155915>

CHANG, Howard H. Y. *et al.* **Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair.** [*S. l.*]: Nature Publishing Group, 2017. Disponível

em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>

CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/em.22087>

CHIRIBAO, María Laura *et al.* Early trypanosoma cruzi infection reprograms human epithelial cells. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, n. 439501, p. 1–12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/439501>

CHOI, M.; KIPPS, T.; KURZROCK, R. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0945>

CHOI, Sunga; KYOUNG JOO, Hee; HWA JEON, Byeong. Dynamic Regulation of APE1/Ref-1 as a Therapeutic Target Protein. © **Chonnam Medical Journal Chonnam Med J**, [S. l.], v. 52, p. 75–80, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.2.75>

COSTALES, Jaime A.; DAILY, Johanna P.; BURLEIGH, Barbara A. Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in Trypanosoma cruzi-infected host cells by comparative mRNA profiling. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 10, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-252>

COVRE, Luciana P. *et al.* Circulating senescent T cells are linked to systemic inflammation and lesion size during human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. JAN, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03001>

CROWLEY, Lisa C.; CHRISTENSEN, Melinda E.; WATERHOUSE, Nigel J. Measuring survival of adherent cells with the Colony-forming assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, [S. l.], v. 2016, n. 8, p. 721–724, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087171>

CURTIN, Nicola J. **DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3399>

DARANI, Hossein Yousofi *et al.* Effects of Toxoplasma gondii and Toxocara canis antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model. **Korean Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 175–177, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.175>

DASARI, Shaloam; BERNARD TCHOUNWOU, Paul. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 5, n. 740, p. 364–378, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DE MOURA, Michelle Barbi *et al.* Cloning and characterization of DNA polymerase η from *Trypanosoma cruzi*: Roles for translesion bypass of oxidative damage. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 375–386, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/em.20450>

DE SOUZA, E. M. *et al.* Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 314, p. 223–235, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0782-5>

DE SOUZA, Wanderley; DE CARVALHO, Tecia Maria Ulisses; BARRIAS, Emile Santos. **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/295394>

DEMARCO, Catherine *et al.* The Role of Cell Cycle Progression in Cisplatin-induced Apoptosis in Chinese Hamster Ovary Cells1. **Cell Growth Differ.**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 983–993, 1994.

DESHPANDE, Nita N. *et al.* Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. **Antioxid Redox Signal** . , [S. l.], v. 4, n. 5, p. 845–854, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/152308602760599007>

DINANT, Christoffel; HOUTSMULLER, Adriaan B.; VERMEULEN, Wim. Chromatin structure and DNA damage repair. **Epigenetics & Chromatin**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-8935-1-9>

DOUKI, T.; SAGE, E. **Dewar valence isomers, the third type of environmentally relevant DNA photoproducts induced by solar radiation**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5pp00382b>

DUMOULIN, Peter C.; BURLEIGH, Barbara A. Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **mBio**, [S. l.], v. 9, n. 4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00673-18>

EBERST, Lauriane; BRAHMI, Medhi; CASSIER, Philippe A. Nouvelles perspectives dans le ciblage thérapeutique de la réparation de l'ADN. **Bull Cancer**, [S. l.], v. 104, n. 11, p. 988–998, 2017.

ELSLAND, Daphne; NEEFJES, Jacques. Bacterial infections and cancer. **EMBO reports**, [S. l.], v. 19, n. 11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/embr.201846632>

FOUSTERI, Maria; MULLENDERS, Leon H. F. **Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: Molecular mechanisms and biological effects**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cr.2008.6>

FRANKENBERG-SCHWAGER, Marlis *et al.* The Role of Nonhomologous DNA End

Joining, Conservative Homologous Recombination, and Single-Strand Annealing in the Cell Cycle-Dependent Repair of DNA Double-Strand Breaks Induced by H₂O₂ in Mammalian Cells. **Radiation Research**, [S. l.], v. 170, n. 6, p. 784–793, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1667/rr1375.1>

FRIEDBERG, Errol C. **DNA damage and repair feature 436 NATURE** [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.nature.com/nature.

FRIMPONG, Augustina *et al.* Phenotypic evidence of T cell exhaustion and senescence during symptomatic plasmodium falciparum Malaria. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. JUN, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01345>

GAGNIÈRE, Johan *et al.* **Gut microbiota imbalance and colorectal cancer**. [S. l.]: Baishideng Publishing Group Co., Limited, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>

GENOIS, M. M. *et al.* DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 40–73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/membr.00045-13>

GONZALEZ, Victor M. *et al.* **Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?** [S. l.: s. n.]. Disponível em: <http://molpharm.aspetjournals.org>.

GORGOLIS, Vassilis *et al.* **Cellular Senescence: Defining a Path Forward**. [S. l.]: Cell Press, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>

GRASSO, Stefano; TELL, Gianluca. **Base excision repair in Archaea: Back to the future in DNA repair**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.05.006>

GU, Long *et al.* The Anticancer Activity of a First-in-class Small-molecule Targeting PCNA. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 6053–6065, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0592>

GUIMARÃES-PINTO, Kamila *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces cellular stress response and senescence-like phenotype in murine fibroblasts. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. JUL, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01569>

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x>

HAMPTON, Mark B.; ORRENIUS, Sten. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. **Febs Letters**, [S. l.], v. 414, p. 552–556, 1997.

HAYASHI, Michio; UMEZU, Keiko. Homologous recombination is required for recovery from oxidative DNA damage. **Genes Genet. Syst.** [S. l.], v. 92, n. 2, p. 73–80, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1266/ggs.16-00066>

HE, Hanqing; WANG, Jiajia; LIU, Ting. UV-Induced RPA1 Acetylation Promotes Nucleotide Excision Repair. **Cell Reports**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.016>

HE, Shenghui; SHARPLESS, Norman E. Senescence in Health and Disease. **Cell**, [S. l.], v. 169, n. 6, p. 1000–1011, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>

HERRANZ, Nicolás; GIL, Jesús. **Mechanisms and functions of cellular senescence.** [S. l.]: American Society for Clinical Investigation, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI95148>

HEUSSLER, Volker T.; ÈENZI, Peter Ku; ROTTENBERG, Sven. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **Int J Parasitol.** [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1166–1176, 2001. Disponível em: www.parasitology-online.com

HEYER, Wolf-Dietrich; EHMTSEN, Kirk T.; LIU, Jie. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, [S. l.], v. 44, p. 113–139, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>

HU, Jinchuan; ADAR, Sheera. **The Cartography of UV-induced DNA Damage Formation and DNA Repair.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.12668>

ISHINO, Sonoko *et al.* Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 2977–2986, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw153>

JARRETT, Stuart G.; ALBON, Julie; BOULTON, Mike. The contribution of DNA repair and antioxidants in determining cell type-specific resistance to oxidative stress. **Free Radical Research**, [S. l.], v. 40, n. 11, p. 1155–1165, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10715760600876613>

JIN, Mei Hua; OH, Do Youn. **ATM in DNA repair in cancer.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.07.002>

KALLINIKOVA, V. D. *et al.* Anticancer properties of flagellate protozoan Trypanosoma cruzi Chagas, 1909. **Biology Bulletin**, [S. l.], v. 3, p. 299–311, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1016636419597>

KAWANISHI, Shosuke *et al.* Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 1808, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.3390/ijms18081808>

KESSLER, Rafael Luis *et al.* Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 712–736, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.13653>

KHORONENKOVA, Svetlana V.; DIANOV, Grigory L. ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 112, n. 13, p. 3997–4002, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1416031112>

KLEIN, Hannah L. *et al.* **Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways**. [S. l.]: Shared Science Publishers OG, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15698/mic2019.01.664>

KUNRATH-LIMA, Marianna *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 55, p. 332–342, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.030>

LI, Lian Tao *et al.* **Predic Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review)**. [S. l.]: Spandidos Publications, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>

LI, Yuan *et al.* Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005511>

LINDSEY-BOLTZ, Laura A. Bringing It All Together: Coupling Excision Repair to the DNA Damage Checkpoint. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 93, n. 1, p. 238–244, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.12667>

LIU, Yunhua; LI, Yujing; LU, Xiongbin. Regulators in the DNA damage response. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 594, p. 18–25, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.018>

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LÓPEZ-CAMARILLO, César *et al.* DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in *Entamoeba histolytica* and related protozoan parasites. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1051–1056, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.024>

LUIJSTERBURG, Martijn S.; VAN ATTIKUM, Haico. **Chromatin and the DNA**

damage response: The cancer connection. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.06.001>

MACHADO-SILVA, Alice *et al.* How Trypanosoma cruzi deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 767, p. 8–22, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>

MACHADO-SILVA, Alice *et al.* **How Trypanosoma cruzi deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>

MACHADO, Carlos Renato *et al.* DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 612, n. 1, p. 40–57, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.05.001>

MAGNUSON, Brian; BEDI, Karan; LJUNGMAN, Mats. Genome stability versus transcript diversity. **DNA Repair**, [S. l.], v. 44, p. 81–86, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.010>

MANQUE, Patricio A. *et al.* Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in Cardiomyocytes. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 79, n. 5, p. 1855–1862, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00643-10>

MARKKANEN, Enni. **Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.09.007>

MATT, Sonja; HOFMANN, Thomas G. **The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells.** [S. l.]: Birkhauser Verlag AG, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2130-4>

MCVEY, Mitch; LEE, Sang Eun. **MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.007>

MELO, Raíssa de Fátima Pimentel; GUARNERI, Alessandra Aparecida; SILBER, Ariel Mariano. **The Influence of Environmental Cues on the Development of Trypanosoma cruzi in Triatominae Vector.** [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00027>

MENCK, Carlos Fm; MUNFORD, Veridiana. **DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging?** [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.sbg.org.br

MENNA-BARRETO, Rubem Figueiredo Sadok; DE CASTRO, Solange Lisboa. **The**

double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. [S. l.]: Hindawi Publishing Corporation, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/614014>

MIKHED, Yuliya *et al.* Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. **Redox Biology**, [S. l.], v. 5, p. 275–289, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.008>

MIYAGAWA, Kiyoshi. Clinical relevance of the homologous recombination machinery in cancer therapy. **Cancer Science**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 187–194, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00644.x>

MORRISH, Tammy A. *et al.* DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 159–165, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng898>

MOUW, Kent W. **DNA repair pathway alterations in bladder cancer.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers9040028>

MÜLLER, Rebekka *et al.* Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070430>

MUNARI, Fernanda Franco *et al.* PIK3CA mutations are frequent in esophageal squamous cell carcinoma associated with chagasic megaesophagus and are associated with a worse patient outcome. **Infectious Agents and Cancer**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0216-3>

MURATA, Mariko. **Inflammation and cancer.** [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0740-1>

MURTA, Eddie Fernando Candido *et al.* **ASSOCIATION OF UTERINE LEIOMYOMA AND CHAGAS' DISEASE.** [S. l.: s. n.]

NAKAJIMA-SHIMADA, Junko *et al.* Inhibition of Fas-mediated apoptosis by Trypanosoma cruzi infection. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1475, n. 2, p. 175–183, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00059-3)

NATARAJAN, Adayapalam T.; PALITTI, Fabrizio. DNA repair and chromosomal alterations. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [S. l.], v. 657, p. 3–7, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.08.017>

NOLL, David M.; MCGREGOR MASON, Tracey; MILLER, Paul S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 106, n. 2, p. 277–301, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr040478b>

O'GRADY, Shane *et al.* The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 40, p. 1161–1170, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.10.003>

OLAISEN, Camilla *et al.* The role of PCNA as a scaffold protein in cellular signaling is functionally conserved between yeast and humans. **FEBS Open Bio**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1135–1145, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12442>

PASSOS-SILVA, Danielle Gomes *et al.* Overview of DNA repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. **Journal of Nucleic Acids**, [S. l.], v. 2010, p. 1–14, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2010/840768>

PEÑA-DIAZ, Javier *et al.* Trypanosoma cruzi contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 342, n. 3, p. 787–799, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.043>

PENG, Duo *et al.* CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in Trypanosoma cruzi. **mBio**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. e02097-14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>

PÉREZ, Juana *et al.* Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the Trypanosomatidae Leishmania major and Trypanosoma cruzi confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient Escherichia coli. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 771–777, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/27.3.771>

PIERROTTI, Lígia Camera *et al.* Chagas Disease Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. **Transplantation**, [S. l.], v. 102, p. S2–S7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002019>

QUEIROZ, Rayner M. L. *et al.* Insight into the Exoproteome of the Tissue-Derived Trypomastigote form of Trypanosoma cruzi. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00042>

RAHAL EA *et al.* ATM regulates Mre11-dependent DNA end-degradation and microhomology-mediated end joining. **Cell Cycle**, [S. l.], v. 9, n. 14, p. 2866–2877, 2010.

RAJÃO, M. A. *et al.* DNA polymerase kappa from Trypanosoma cruzi localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 185–197, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06521.x>

RAMIREZ-TOLOZA, Galia *et al.* Is it all That Bad When Living with an Intracellular Protozoan? The Role of Trypanosoma cruzi Calreticulin in Angiogenesis and Tumor Growth.

Frontiers in Oncology, [S. l.], v. 4, p. 1–6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00382>

REGIS-DA-SILVA, Carlos Gustavo *et al.* Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 149, n. 2, p. 191–200, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.012>

REPOLÊS, Bruno M.; MACHADO, Carlos Renato; FLORENTINO, Pilar T. V. **DNA lesions and repair in trypanosomatids infection**. [S. l.]: Brazilian Journal of Genetics, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0163>

RIBEIRO, Daniel A. *et al.* DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology**, [S. l.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.12.007>

ROCHA, Clarissa Ribeiro Reily *et al.* **DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship**. [S. l.]: Universidade de Sao Paulo, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>

ROOS, Wynand P.; THOMAS, Adam D.; KAINA, Bernd. **DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>

ROSE, Ester; CARVALHO, Juliana Lott; HECHT, Mariana. **Mechanisms of DNA repair in Trypanosoma cruzi: What do we know so far?**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102873>

ROUILLON, Christophe; WHITE, Malcolm F. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 162, n. 1, p. 19–26, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.003>

RYAN, E. *et al.* **The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.006>

SALES-CAMPOS, Helioswilton *et al.* Trypanosoma cruzi DTU TcII presents higher blood parasitism than DTU TcI in an experimental model of mixed infection. **Acta Parasitologica**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 435–441, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0060>

SAMALI, Afshin *et al.* **A Comparative Study of Apoptosis and Necrosis in HepG2 Cells: Oxidant-Induced Caspase Inactivation Leads to Necrosis**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of Experimental Chagas Disease III. Rejection of Allogeneic Heart Cells in Vitro. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 140, p. 38–53, 1974.

SAXENA, Ritu *et al.* CX3CL1 binding protein-2 (CBP2) of Plasmodium falciparum binds nucleic acids. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 138, p. 996–1005, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.178>

SEIFERMANN, Marco; EPE, Bernd. **Oxidatively generated base modifications in DNA: Not only carcinogenic risk factor but also regulatory mark?**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.018>

SEOL, Ja Hwan; SHIM, Eun Yong; LEE, Sang Eun. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 809, p. 81–87, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002>

SHARMA, Vyom *et al.* Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 18, p. 25377–25390, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.018>

SIDDIK, Zahid H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, [S. l.], v. 22, p. 7265–7279, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>

SIES, Helmut. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>

SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative Stress. **Annu Rev Biochem**, [S. l.], v. 86, p. 715–748, 2017.

SLUPPHAUG, Geir; KAVLI, Bodil; KROKAN, Hans E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 531, p. 231–251, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002>

STAHL, Philipp *et al.* Trypomastigotes and amastigotes of Trypanosoma cruzi induce apoptosis and STAT3 activation in cardiomyocytes in vitro. **Apoptosis**, [S. l.], v. 18, p. 653–663, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0822-x>

SUWAKI, Natsuko; KLARE, Kerstin; TARSOUNAS, Madalena. **RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.019>

SUZUKI, Jun *et al.* Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 5, n. 4, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000461>

TALEEI, Reza; NIKJOO, Hooshang. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [S. l.], v. 756, p. 206–212, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.004>

TARLETON, Rick L.; ZHANG, L. **Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence?**. [S. l.: s. n.] Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01398-8](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01398-8)

TAYLOR, Sean C. *et al.* **The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, [S. l.], v. 82, p. 788–798, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047357>

TEIXEIRA, Antonio R. L. *et al.* Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. **Cad. Saúde Pública**, [S. l.], v. 25, p. S32–S44, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2009001300004>

TROYANO, A. *et al.* **The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401249>

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 31, p. 472–481, 2001. Disponível em: www.parasitology-online.com

UBILLOS, Luis *et al.* *Trypanosoma cruzi* extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 138, p. 1719–1731, 2016.

VAISMAN, Alexandra; WOODGATE, Roger. **Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick?**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1291576>

VAN HOUTEN, Bennett; WOSHNER, Victoria; SANTOS, Janine H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. **DNA Repair**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 145–152, 2006 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.03.002>

VAN HOUTEN, Bennett; WOSHNER, Victoria; SANTOS, Janine H. **Role of**

mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. [S. l.]: Elsevier, 2006 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.03.002>

VARGAS-ZAMBRANO, Juan Camilo *et al.* A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 212–219, 2013.

VILEMA-ENRÍQUEZ, Gabriela *et al.* **Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells: Potential therapeutic implications.** [S. l.]: Hindawi Limited, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/1908164>

WATANABE COSTA, Renata; DA SILVEIRA, Jose F.; BAHIA, Diana. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 388, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00388>

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. The Molecular Structure of Nucleic Acids. **Nature**, [S. l.], v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.

WEI, Wenqiang; JI, Shaoping. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. **J Cell Physiol.**, [S. l.], v. 233, n. 12, p. 9121–9135, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.26956>

WEITZMAN, Matthew D.; WEITZMAN, Jonathan B. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. **Cell Host and Microbe**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 283–294, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.010>

WESLEY, Moisés *et al.* Correlation of parasite burden, kdna integration, autoreactive antibodies, and cytokine pattern in the pathophysiology of chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. AUG, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01856>

WHITE, Malcolm F.; ALLERS, Thorsten. **DNA repair in the archaea-an emerging picture.** [S. l.]: NLM (Medline), 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy020>

WHITE, Travis B.; MORALES, Maria E.; DEININGER, Prescott L. Alu elements and DNA double-strand break repair. **Mobile Genetic Elements**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 81–85, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/2159256X.2015.1093067>

WHO, World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Fact sheet 340**, [S. l.], 2017.

WIMAN, K. G.; ZHIVOTOVSKY, B. **Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/joim.12609>

WRIGHT, William Douglass; SHAH, Shanaya Shital; HEYER, Wolf Dietrich. **Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks.** [S. l.]: American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>

XIE, Maohua; DOETSCH, Paul W.; DENG, Xingming. Bcl2 inhibition of mitochondrial DNA repair. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1594-1>

YAKES, Michael F.; VAN HOUTEN, Bennett. **Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress** **Cell Biology**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.pnas.org.

YANAMADALA, Sunitha; LJUNGMAN, Mats. **Potential Role of MLH1 in the Induction of p53 and Apoptosis by Blocking Transcription on Damaged DNA Templates.** [S. l.: s. n.].

YANG, Wei; GAO, Yang. Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>

YUN, Maximina H.; HIOM, Kevin. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. **Nature**, [S. l.], v. 459, n. 7245, p. 460–463, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07955>

ŽGUR-BERTOK, Darja. DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003711>

ZHAO, Meng Xin *et al.* Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. **Cell Stress and Chaperones**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 609–619, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00993-1>

ZHU, Shiyao *et al.* DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Archives of Toxicology**, [S. l.], v. 89, n. 12, p. 2197–2205, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1633-3>

ZINGALES, Bianca. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, [s. l.], 2017 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

ZINGLER, Nora *et al.* Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. **Genome Research**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 780–789,

2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.3421505>

X. ANEXO I

Tabela com todos os resultados compilados do tratamento com Cisplatina em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*.

Cisplatina		Sem tratamento		
		L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana
Mortalidade (Sub-G1)		=	↑↑ 2	↑↑ 2
Tipo de morte celular	Necrose	=	=	=
	Apoptose	=	=	=
	Apoptose Tardia	=	=	=
Degradação de DNA (cometa)		=	=	=
Proliferação (Colônias)		=	=	↓↓↓↓ 13
Proliferação (Grupos pequenos)		=	=	=
Proliferação (Células sozinhas)		=	=	=
Ciclo celular (G1)		=	=	=
Morfologia		=	=	=
Expressão gênica	BCL2	=	=	=
	P53	=	=	=
	ATM	=	=	=
	BRCA1	=	=	=
	MSH2	=	=	=
	OGG1	=	=	=
	PCNA	=	=	=
	RAD51	=	=	=
	RPA1	=	=	=
	XPA	=	=	=
	XRCC1	=	=	=
	XRCC4	=	=	=
	LINE1 ORF2	=	=	=
	P16	=	=	=
P21	=	=	=	
Ki67	=	=	=	
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	-	-
	TcPCNA	-	-	-
	TcMSH2	-	-	-

Cisplatina		Cisplatina 25µM			Cisplatina 100µM		
		L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana	L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana
Mortalidade (Sub-G1)		=	=	=	=	=	=
Degradação de DNA (cometa)		=	=	=	=	=	=
Ciclo celular (G1)		=	=	=	=	=	=
Expressão gênica	BCL2	=	=	=	=	↓↓↓ 3	=
	P53	=	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	=	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3
	ATM	=	↑ 1	=	=	↑ 1	=
	BRCA1	=	=	=	=	=	=
	MSH2	=	↑↑ 2	=	=	↑ 1	=
	OGG1	=	=	=	=	=	=
	PCNA	↑↑↑ 3	↑↑ 2	↑↑ 2	=	=	↑↑↑↑ 4
	RAD51	↑↑↑ 3	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
	RPA1	=	↑↑ 2	↑↑ 2	=	↑↑ 2	↑↑ 2
	XPA	=	↓↓ 2	↓↓ 2	=	↓↓ 2	↓↓ 2
	XRCC1	=	=	=	=	↑ 1	↑ 1
	XRCC4	↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓ 5
	LINE1 ORF2	=	=	=	=	=	=
	P16	=	=	=	=	=	=
	P21	↑↑↑↑ 5	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5
	Ki67	=	↓↓ 2	↓↓ 2	=	↓↓ 2	↓↓ 2
	<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	↓↓↓↓ 13	=	-	↓↓↓↓ 10
TcPCNA		-	↑↑↑ 3	=	-	↑↑↑ 3	=
TcMSH2		-	=	=	-	↑↑↑↑ 4	=

Cisplatina		Cisplatina 25µM			Cisplatina 100µM		
		L6	L6 + Berenice	L6 + Colombiana	L6	L6 + Berenice	L6 + Colombiana
Mortalidade (Sub-G1)		=	=	=	=	=	=
Degradação de DNA (cometa)		=	=	=	=	=	=
Ciclo celular (G1)		=	=	=	=	=	↓ 1
Expressão gênica	BCL2	=	=	=	=	↓↓↓↓↓ 10	↓↓↓↓↓ 10
	P53	=	=	=	=	=	=
	ATM	↑↑ 2	↑ 1	=	=	=	=
	BRCA1	=	=	=	=	=	=
	MSH2	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑ 2	=	↑ 1	↑ 1
	OGG1	↑ 1	↑ 1	↑ 1	=	=	=
	PCNA	↑↑↑ 3	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4
	RAD51	↑↑↑↑ 7	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
	RPA1	=	=	=	=	=	=
	XPA	=	=	=	=	=	=
	XRCC1	=	=	=	=	=	=
	XRCC4	↓↓↓↓↓ 13	↓↓↓↓↓ 13	↓↓↓↓↓ 13	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30
	LINE1 ORF2	=	=	=	=	=	=
	P16	=	=	=	=	=	=
	P21	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3
	Ki67	=	↓↓ 2	↓↓ 2	=	↓↓ 2	↓↓ 2
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	↓↓↓↓↓ 13	=	-	↓↓↓↓↓ 10	=
	TcPCNA	-	↑↑↑ 3	=	-	↑↑↑ 3	=
	TcMSH2	-	=	=	-	=	=

Cisplatina		Cisplatina 25µM			Cisplatina 100µM		
		L6	L6 + Berenice	L6 + Colombiana	L6	L6 + Berenice	L6 + Colombiana
Mortalidade (Sub-G1)		↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 7	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 7
Tipo de morte celular	Necrose	=	=	↑ 1	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
	Apoptose	=	=	=	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3
	Apoptose Tardia	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3
Degradação de DNA (cometa)		=	↑↑↑↑ 7	=	↑↑↑↑ 16	↑↑↑↑ 25	↑↑↑↑ 16
Proliferação (Colônias)		↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30
Proliferação (Grupos pequenos)		↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ 4	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30
Proliferação (Células sozinhas)		↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 7	↑↑↑ 3	↑ 1	↑ 1	↓ 1
Ciclo celular (G1)		↓↓ 2	↓↓ 2	↓ 1	↓ 1	↓↓ 2	↓ 1
Morfologia		↑↑ 2	=	↑ 1	=	=	=
Expressão gênica	BCL2	=	=	=	↓↓↓↓↓ 4	↓↓↓↓↓ 4	↓↓↓↓↓ 4
	P53	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
	ATM	=	=	↓↓ 2	=	=	↓↓ 2
	BRCA1	↑↑↑↑ 4	↑↑ 2	=	↑↑ 2	↑↑ 2	=
	MSH2	↑↑ 2	↑ 1	↓↓↓↓↓ 7	=	↑ 1	=
	OGG1	↑ 1	=	↓↓↓ 3	=	=	=
	PCNA	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 7	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 7
	RAD51	↑↑↑↑ 4	↑↑ 2	=	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
	RPA1	=	=	=	=	=	=
	XPA	=	=	=	=	=	=
	XRCC1	=	=	=	=	↓↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓↓ 5
	XRCC4	↓↓↓↓↓ 5	↓↓↓↓↓ 5	=	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30	↓↓↓↓↓ >30
	LINE1 ORF2	=	=	↑↑↑↑ 4	=	=	↑↑↑ 3
	P16	↓↓↓ 3	=	↑↑↑↑ 16	=	=	↑↑↑↑ 5
P21	↑↑↑↑ 7	↑↑ 2	=	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	
Ki67	=	=	↑↑↑↑ 4	=	=	=	
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	↓↓↓↓↓ 13	=	-	↓↓↓↓↓ 25	↑↑↑↑ >30
	TcPCNA	-	=	↓↓ 2	-	↑↑↑ 3	=
	TcMSH2	-	=	=	-	=	↑↑ 2

XI. ANEXO II

Tabela com todos os resultados compilados do tratamento com Peróxido de Hidrogênio em células L6, infectadas ou não pelo *Trypanosoma cruzi*.

0h		Sem tratamento		
H2O2		L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana
Mortalidade (Sub-G1)		=	↑↑ 2	↑↑ 2
Tipo de morte celular	Necrose	=	=	=
	Apoptose	=	=	=
	Apoptose Tardia	=	=	=
Degradação de DNA (cometa)		=	=	=
Proliferação (Colônias)		=	=	↓↓↓↓ 13
Proliferação (Grupos pequenos)		=	=	=
Proliferação (Células sozinhas)		=	=	=
Ciclo celular (G1)		=	=	=
Morfologia		=	=	=
Expressão gênica	BCL2	=	=	=
	P53	=	=	=
	ATM	=	=	=
	BRCA1	=	=	=
	MSH2	=	=	=
	OGG1	=	=	=
	PCNA	=	=	=
	RAD51	=	=	=
	RPA1	=	=	=
	XPA	=	=	=
	XRCC1	=	=	=
	XRCC4	=	=	=
	LINE1 ORF2	=	=	=
P16	=	=	=	
P21	=	=	=	
Ki67	=	=	=	
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	-	-
	TcPCNA	-	-	-
	TcMSH2	-	-	-

4h		H2O2 0,8mM			H2O2 1,6mM		
H2O2		L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana	L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana
Mortalidade (Sub-G1)		=	=	=	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
Degradação de DNA (cometa)		↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 16	↑↑ 2	↑↑ 2
Ciclo celular (G1)		=	=	=	=	=	=
Expressão gênica	BCL2	=	=	=	=	=	=
	P53	↑↑↑ 3	↑↑ 2	↑↑↑ 3	=	↑↑ 2	=
	ATM	↑ 1	=	=	=	=	=
	BRCA1	↑ 1	=	=	=	=	=
	MSH2	↑ 1	=	=	↑↑ 2	↑ 1	=
	OGG1	↑↑ 2	↑ 1	=	=	=	=
	PCNA	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 5	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 4
	RAD51	↑↑ 2	↑ 1	↑↑ 2	=	↑ 1	=
	RPA1	=	=	=	=	=	↑↑↑ 3
	XPA	=	=	=	=	=	=
	XRCC1	↑ 1	↑ 1	↑ 1	=	↑ 1	=
	XRCC4	=	=	=	=	=	=
	LINE1 ORF2	=	=	=	=	=	=
P16	=	=	=	=	=	=	
P21	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 13	↑↑↑↑ 13	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	↑↑↑↑ 4	
Ki67	=	=	=	=	=	=	
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	=	=	-	↓↓↓ 3	=
	TcPCNA	-	↑↑ 2	=	-	=	=
	TcMSH2	-	=	=	-	=	=

12h

H2O2		H2O2 0,8mM			H2O2 1,6mM		
		L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana	L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana
Mortalidade (Sub-G1)		=	=	=	=	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 5
Degradação de DNA (cometa)		↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19
Ciclo celular (G1)		↓ 1	↓ 1	=	=	=	=
Expressão gênica	BCL2	=	=	=	=	=	=
	P53	=	↑↑ 2	=	=	↑↑↑↑ 7	=
	ATM	↑↑ 2	↑ 1	↑ 1	=	=	=
	BRCA1	=	=	=	=	=	=
	MSH2	=	=	=	=	↑ 1	=
	OGG1	=	↑ 1	=	=	↑↑ 2	=
	PCNA	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5
	RAD51	↑↑ 2	↑ 1	↑↑ 2	=	=	=
	RPA1	=	=	=	=	=	=
	XPA	=	=	=	=	=	=
	XRCC1	=	=	=	=	=	=
	XRCC4	=	=	=	=	=	=
	LINE1 ORF2	↓↓ 2	=	=	=	=	=
	P16	=	=	=	=	=	=
	P21	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19
Ki67	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	=	=	-	↓↓↓ 3	=
	TcPCNA	-	↑↑ 2	=	-	↑↑ 2	↑↑↑ 3
	TcMSH2	-	=	=	-	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 5

24h

H2O2		H2O2 0,8mM			H2O2 1,6mM		
		L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana	L6	L6 + Berenice	L6 + Colom-biana
Mortalidade (Sub-G1)		=	↑↑↑↑ 7	↑↑↑ 3	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 5
Tipo de morte celular	Necrose	↑ 1	↑ 1	=	↑ 1	↑ 1	↑ 1
	Apoptose	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3
	Apoptose Tardia	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑↑ 3	↑↑↑ 3
Degradação de DNA (cometa)		↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 19	↑↑↑↑ 13	↑↑↑↑ 13	↑↑↑↑ 13
Proliferação (Colônias)		↓↓↓ >30	↓↓↓ >30	↓↓↓ >30	↓↓↓ >30	↓↓↓ >30	↓↓↓ >30
Proliferação (Grupos pequenos)		=	=	=	↓↓↓ 19	↓↓↓ 19	↓↓↓ 19
Proliferação (Células sozinhas)		↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 7	↑↑↑↑ 7	↑↑↑↑ 7
Ciclo celular (G1)		=	↓ 1	=	=	↓ 1	↓ 1
Morfologia		↑ 1	↑ 1	↑ 1	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2
Expressão gênica	BCL2	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	↓↓↓ 3	=	↓↓↓ 5	=
	P53	=	↑↑↑↑ 4	=	=	=	=
	ATM	=	=	=	=	=	=
	BRCA1	=	=	=	=	=	=
	MSH2	=	=	=	=	=	=
	OGG1	=	↑↑ 2	=	=	=	=
	PCNA	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑ 2	↑↑↑↑ 5	↑↑ 2	↑↑↑↑ 5
	RAD51	=	=	=	=	=	=
	RPA1	=	=	=	=	=	=
	XPA	=	=	=	=	↓↓↓ 3	=
	XRCC1	=	=	=	=	↓↓↓ 4	=
	XRCC4	=	=	=	=	=	=
	LINE1 ORF2	=	=	=	=	=	=
	P16	=	=	=	=	=	=
	P21	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 10	↑↑↑↑ 5	↑↑↑↑ 10
Ki67	↓↓ 2	↓↓ 2	↓↓ 2	↓↓ 2	↓↓ 2	↓↓ 2	
<i>T. cruzi</i>	Tc40S (Quantif)	-	=	=	-	=	=
	TcPCNA	-	↑↑ 2	=	-	↑↑ 2	=
	TcMSH2	-	=	=	-	=	↑↑ 2