



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DANIELE DAS GRAÇAS DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ENZIMA DNA  
TOPOISOMERASE II NO MOSQUITO *Aedes aegypti***

RIO DE JANEIRO  
2021

DANIELE DAS GRAÇAS DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ENZIMA DNA  
TOPOISOMERASE II NO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Química Biológica.

Orientador: Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

RIO DE JANEIRO  
2021

### CIP - Catalogação na Publicação

ds237c      das Graças dos Santos, Daniele  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ENZIMA  
DNA TOPOISOMERASE II NO MOSQUITO *Aedes aegypti* /  
Daniele das Graças dos Santos. -- Rio de Janeiro,  
2021.  
199 f.

Orientador: Jorge Luiz da Cunha Moraes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo  
de Meis, Programa de Pós-Graduação em Química  
Biológica, 2021.

1. *Aedes aegypti*. 2. DNA Topoisomerase 2. 3.  
Células Aag2. 4. Etoposideo. I. Luiz da Cunha  
Moraes, Jorge, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniele das Graças dos Santos

Caracterização Estrutural e Funcional da Enzima DNA topoisomerase II no Mosquito  
*Aedes aegypti*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Química Biológica.

Aprovada em 29/ 01/2021.

---

Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes, Professor Associado, UFRJ-Macaé.  
(orientador)

---

Dr. André Luis Souza dos Santos, Professor Titular, UFRJ.  
(Banca examinadora)

---

Dra. Rafaela Vieira Bruno, Pesquisadora Titular, Fundação Oswaldo Cruz.  
(Banca Examinadora)

---

Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine, Professor Associado, UFRJ.  
(Banca Examinadora)

---

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira, Professor Titular, UFRJ.  
(Suplente Interno e revisor)

---

Dr. André Luiz de Souza Cruz, Professor Adjunto, UFRJ-Macaé.  
(Suplente externo)

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório Integrado de Bioquímica Hatsaburo Masuda (LIBHM) do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento-NUPEM/ Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro de Macaé, sob a orientação do Professor Jorge Luiz da Cunha Moraes, com auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entologia Molecular (INCTEM).

## DEDICATÓRIA

***Este trabalho é dedicado especialmente,***

Ao meu querido Zé, meu melhor amigo e incentivador.  
Você me inspira todos os dias.

À minha irmã Viviane Santos, por ser um  
exemplo de força diária desde sempre, a primeira  
professora da família.

À minha mãe Neuza por todo amor e incentivo.

Aos meus sobrinhos, pelo afeto genuíno.  
Simbolizando aqui, que vocês podem conquistar  
tudo o quiserem nesta vida.

*(Vocês fazem de mim um ser humano melhor).*

## AGRADECIMENTOS

*“Não há no mundo exagero  
mais belo que a gratidão”- Jean de la Bruyere.*

A Deus por me conceder saúde para chegar até aqui, por me capacitar a cada dia, se manifestando em minha vida através de pessoas tão especiais neste caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Moraes, pela oportunidade e principalmente pela confiança em desempenhar este trabalho em um curso de excelência na UFRJ.

Á todos os docentes do curso de Pós-graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ, pela colaboração e empenho nos conhecimentos transmitidos. Em especial a prof. Pedro de Oliveira, pelo acompanhamento desde trabalho desde o início no papel de revisor de tese na Pós-graduação. Obrigada por toda discussão e troca de saberes (Aprendi muito com a subjetividade do seu olhar crítico a cada correção).

Á Vanessa Bottino, pós-doutoranda do Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos do IBqM na época, pelo auxílio com a células no início do doutorado. Obrigada por responder gentilmente a tantas dúvidas em vários momentos que precisei.

Ao Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno da Silva, em especial a você Zé, pela colaboração ativa durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo treinamento com cultivo de células, verificação de sequências, ajuste de inúmeros protocolos e tantas outras etapas. Pelo comprometimento científico e cuidado demonstrado por cada aluno do Laboratório Integrado de Bioquímica Hatsaburo Masuda (LIBHM)-UFRJ/Macaé. Pela sua empatia inspiradora na figura de educador neste espaço. No mais importante, obrigada pela parceria diária e por tanto mais (não caberia tudo aqui). Sou e serei grata pra sempre!

A Prof<sup>a</sup> Nelilma Romero e seu aluno de doutorado André Borges do Laboratório Integrado de Computação Científica-UFR/Macaé pela importante contribuição durante os estudos de Modelagem Comparativa. Pela leveza de cada reunião, regada a muito café, risos e aprendizado. Valeu André!

Á Profª Laura Weber por ceder gentilmente o Kit (Annexin-V-Fluos) para marcação das células, sempre tão disposta a me ajudar em todas as circunstâncias e imprevistos.

Ao Prof. João Wanderley pela colaboração durante os experimentos de citometria de fluxo no Laboratório de Imunoparasitologia-UFRJ/Macaé, pela forma agradável e comprometida que se dispôs a me ensinar um pouco da técnica e contribuir com este trabalho.

Ao Prof. Rodrigo Nunes e seu aluno de pós-doutorado Lupis Ribeiro, pela colaboração durante os experimentos de Hibridização a *in situ* e treinamento na Lupa. Valeu Lupis!

Á todo o corpo técnico, aos professores, alunos de IC e pós-graduandos dos espaços integrados do NUPEM/UFRJ por onde circulei ao longo destes anos, muito obrigada!

Á Carina Azevedo, minha tão estimada amiga de caminhada nessa montanha russa que é o doutorado, obrigada pela acolhida, longas conversas e abraços apertados em dias difíceis. Você tornou esse caminho melhor, tenho muito orgulho de você. Muito obrigada por tudo!

Á minha família (macaense), representados aqui pela Paula Veronesi (Paulete) e Taynan Portal, amigos queridos que a academia me deu. Obrigada pelo amor diário a cada abraço cheio de afeto ao longo desses anos, por todas gargalhadas e também pelos puxões de orelha quando foi preciso. Vocês foram essenciais nesse percurso, presentes de Deus na minha vida (Gratidão, amo vocês família).

Á minha família (biológica), agradeço principalmente pela compreensão constante em todas as vezes que eu não pude está presente. Vocês são meu porto seguro, sem rótulos ou títulos, o meu melhor lugar no mundo e isso nunca vai mudar. Mãe, obrigada por todo incentivo e orações, mesmo sem entender direito minhas inúmeras ausências. Obrigada, a cada um de vocês, crianças a tia Dani ama muito vocês.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo no doutorado, tornando possível a produção desta tese.



Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta tese, o meu sincero agradecimento.

**EPÍGRAFE**

*“Andá com fé eu vou  
Que a fé não costuma faiá  
Andá com fé eu vou  
Que a fé não costuma faiá  
Que a fé tá na mulher  
A fé tá na cobra coral  
Oh oh  
Num pedaço de pão  
A fé tá na maré  
Na lâmina de um punhal  
Oh oh  
Na luz, na escuridão...  
A fé tá na manhã  
A fé tá no anoitecer  
No calor do verão  
A fé tá viva e sã...  
A pé ou de avião  
Certo ou errado até  
A fé vai onde quer que eu vá  
Oh oh  
Mesmo a quem não tem fé  
A fé costuma acompanhar”*

(Andar com fé, Gilberto Gil, 1982)

## RESUMO

Santos, Daniele das Graças. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ENZIMA DNA TOPOISOMERASE II NO MOSQUITO *Aedes aegypti*. Tese. Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

As enzimas DNA topoisomerases II mantem a estabilidade do DNA durante processos vitais como a replicação, a transcrição e a segregação cromossômica mitótica. Por sua importância em vias essenciais à sobrevivência, essas enzimas são consideradas alvos no desenvolvimento de fármacos antitumorais, antibacterianos e antiparasitários. No presente trabalho caracterizamos aspectos estruturais e funcionais da enzima DNA topoisomerase II (*AeTop2*) do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de diversas arboviroses, como dengue, Zika e chikungunya. Inicialmente foi observado que o genoma de *Ae. aegypti* apresenta um único gene para essa enzima, que compartilha 66% de similaridade com a enzima Top2- $\alpha$  humana. O mRNA de *AeTop2* é expresso em todos os estágios de desenvolvimentos, sendo que em fêmeas adultas alimentadas com sangue, o ovário foi o órgão com maior expressão desse gene. Por hibridização *in situ*, foi verificado que o mRNA de *AeTop2* está concentrado ao longo das células foliculares que compõe cada ovócito. Com o objetivo de validar *in silico* o uso do inibidor comercial etoposídeo, foram identificadas, por *docking* molecular, interações entre esse inibidor e um modelo de *AeTop2* construído por homologia. O inibidor foi então empregado em ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a importância dessa enzima à biologia do *Ae. aegypti*. Observamos que larvas do 2º estágio expostas ao etoposídeo tiveram menor sobrevivência, com atraso no desenvolvimento e morfologia alterada. Ensaios *in vitro* com a linhagem celular Aag2 mostraram que extratos nucleares apresentaram atividade de decatenação do kDNA (de *Crithidia fasciculata*) que é totalmente inibida a partir de 100  $\mu$ M de etoposídeo. As células Aag2 apresentam IC<sub>50</sub> para o etoposídeo de 121,45  $\mu$ M e 64,78  $\mu$ M para os tempos de 24 e 48 horas, respectivamente, exibindo também proliferação reduzida e morfologia semelhante à apoptótica. A apoptose foi confirmada através da fragmentação internucleossômica do DNA, alterações na permeabilidade de membrana e exposição de fosfatidilserina na superfície celular. Por fim, verificamos, por citometria de fluxo, que

concentrações na faixa de 10  $\mu\text{M}$  de etoposídeo promovem a parada do ciclo celular em G2/M, com o surgimento de uma população de células tetraploides e níveis baixos de morte celular, enquanto concentrações na faixa de 100  $\mu\text{M}$  do inibidor bloqueiam o ciclo no ponto de checagem ao final de G1 e promovem morte celular massiva. Assim, AeTop2 pode ser considerada uma enzima vital ao desenvolvimento de *Ae aegypti* e sua sensibilidade a inibidores pode ser explorada no planejamento de novas moléculas em estratégias de controle vetorial.

## ABSTRACT

Santos, Daniele das Graças. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE DNA TOPOISOMERASE II ENZYME IN THE MOSQUITO *Aedes aegypti*. Thesis. Post-Graduation in Biological Chemistry, Leopoldo de Meis Medical Biochemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

DNA topoisomerases II enzymes maintain DNA stability during vital processes, such as replication, transcription and mitotic chromosomal segregation. Due to their importance in essential pathways, these enzymes are considered as targets for the development of antitumor, antibacterial and antiparasitic drugs. Here, we characterize structural and functional aspects of the DNA topoisomerase II enzyme (*AeTop2*) of *Aedes aegypti* mosquito, vector of several arboviruses, such as dengue, Zika and chikungunya. Initially we observed that *Ae. aegypti* presents a single gene for this enzyme, which shares 66% similarity with human Top2- $\alpha$ . *AeTop2* mRNA is expressed at all developmental stages and, in adult females fed on blood, the ovary was the organ with the highest expression. By *in situ* hybridization, it was verified that the *AeTop2* mRNA is concentrated along the follicular cells that make up each oocyte. In order to validate the use of the inhibitor etoposide, we identified, by molecular docking, interactions between this inhibitor and a homology-based model of *AeTop2*. The inhibitor was then used for *in vitro* and *in vivo* assays to assess the importance of this enzyme to the biology of *Ae. aegypti*. We observed that 2nd stage larvae exposed to etoposide suffered reduction in survival, with developmental delay and altered morphology. *In vitro* tests with the cell line Aag2 showed that nuclear extracts present kDNA (of *Crithidia fasciculata*) decatenation activity that is totally inhibited with 100  $\mu$ M of etoposide. Aag2 cells have IC<sub>50</sub> for etoposide of 121.45  $\mu$ M and 64.78  $\mu$ M for treatments of 24 and 48 hours, respectively. These cells also presented reduced proliferation and apoptotic-like morphology. Apoptotic death was further confirmed by internucleosomal DNA fragmentation, assessment of changes in membrane permeability and cell surface exposure of phosphatidylserine. Finally, it was shown, by flow cytometry, that concentrations in the 10  $\mu$ M range of etoposide promote cell cycle arrest in G2/M, with low levels of cell death and emergence of a population of tetraploid

cells, while etoposide concentrations in the range 100  $\mu\text{M}$  block the cell cycle at the G1 checkpoint, promoting massive cell death. Thus, AeTop2 can be considered a vital enzyme for the development of *Ae aegypti* and its sensitivity to inhibitors can help the design of new molecules for vector control strategies.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	24
<b>Figura 2.</b> Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> se alimentando de sangue humano. ....	26
<b>Figura 3.</b> Mapa global da distribuição prevista de <i>Aedes aegypti</i> .....	31
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das reações catalisadas pelas enzimas topoisomerases. 46	
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de ação geral proposto para as enzimas DNA topoisomerases I.....	47
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo de comparação entre os domínios funcionais das DNA topoisomerases IIA de <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i> .....	50
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da organização dos domínios funcionais da topoisomerase II $\beta$ humana .....	51
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação proposto para as DNA topoisomerases tipo IIA.....	53
<b>Figura 9.</b> Atuação das DNA topoisomerases na replicação. ....	55
<b>Figura 10.</b> Estrutura química do etoposídeo (VP-16-213).....	59
<b>Figura 11.</b> Ciclo de quantificação DNA topoisomerase II. ....	68
<b>Figura 12.</b> Alinhamento múltiplo das sequências peptídicas previstas de três enzimas DNA Topoisomerase II de animais.....	96
<b>Figura 13.</b> Reconstruções filogenéticas propostas para enzima DNA topoisomerase II de 14 metazoários. ....	96
<b>Figura 14.</b> Sobreposição da estrutura do molde 3QX3 e do modelo AeTop2 construído por modelagem comparativa. ....	97
<b>Figura 15.</b> Representação do gráfico de Ramachandran. ....	99
<b>Figura 16.</b> Análise da energia potencial do molde 3QX3 e dos modelos de AeTop2. ....	101
<b>Figura 17.</b> Análise dos valores de Z-score para o molde (3QX3) e modelo construído.....	103
<b>Figura 18.</b> Estrutura tridimensional do molde HsTop2- $\beta$ - 3QX3 e do modelo AeTop2.....	104
<b>Figura 19.</b> Representação do mapa de potencial eletrostático do molde 3QX3 e do modelo refinado AeTop2. ....	105

<b>Figura 20.</b> <i>Redocking</i> do etoposídeo na estrutura resolvida da enzima DNA topoisomerase II- $\beta$ humana. ....	106
<b>Figura 21.</b> Representação bidimensional (2D) das interações moleculares obtidas por <i>docking</i> . 109	
<b>Figura 22.</b> Representação do <i>docking</i> do etoposídeo na presença da superfície de potencial eletrostático. ....	111
<b>Figura 23.</b> Representação dos resíduos de aminoácidos que interagem no <i>docking</i> do etoposídeo nas cadeias A e B enzima DNA topoisomerase II.....	112
<b>Figura 24.</b> Expressão relativa do mRNA da enzima DNA topoisomerase II nos estágios iniciais do ciclo de vida do mosquito <i>Ae. aegypti</i> . ....	114
<b>Figura 25.</b> Expressão relativa do mRNA da enzima DNA Topoisomerase II em fêmeas <i>Ae. aegypti</i> . ....	116
<b>Figura 26.</b> Hibridização <i>in situ</i> do mRNA da enzima <i>AeTop2</i> em ovários de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com sangue.. ....	117
<b>Figura 27.</b> Hibridização <i>in situ</i> do mRNA da enzima <i>AeTop2</i> nos folículos ovarianos de fêmeas <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com sangue.....	118
<b>Figura 28.</b> Hibridização <i>in situ</i> do mRNA do gene <i>oskar</i> em ovários e folículos ovarianos de <i>Ae. aegypti</i> . ....	119
<b>Figura 29.</b> Bioensaio com larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas ao etoposídeo. ....	120
<b>Figura 30.</b> Pools (ou grupos) representativos de larvas de <i>Ae. aegypti</i> observadas no 8° dia de exposição ao inibidor etoposídeo.....	123
<b>Figura 31.</b> Morfologia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 10 dias de exposição ao etoposídeo.....	125
<b>Figura 32.</b> Pupas de <i>Ae. aegypti</i> formadas durante a exposição ao inibidor etoposídeo (visão lateral).....	127
<b>Figura 33.</b> Análise da viabilidade celular pelo método de MTT das células Aag2 expostas a concentrações crescentes do inibidor etoposídeo. ....	128
<b>Figura 34.</b> Análise da proliferação celular das células Aag2 expostas a doses crescentes do inibidor etoposídeo pelo método de cristal violeta. ....	132
<b>Figura 35.</b> Poços de cultura de células coradas com cristal violeta após 48 e 96 horas de exposição a doses crescentes do inibidor etoposídeo. ....	133
<b>Figura 36.</b> Alterações morfológicas das células Aag2 após o tratamento com etoposídeo por 48 horas.....	135



<b>Figura 37.</b> Alterações morfológicas das células Aag2 após o tratamento com etoposídeo por 96 horas.....	136
<b>Figura 38.</b> Perfil dos núcleos e morfologia celular das células Aag2 após o tratamento com etoposídeo. ....	140
<b>Figura 39.</b> Fragmentação internucleossômica do DNA de células Aag2 expostas ao etoposídeo. ....	142
<b>Figura 40.</b> Marcação com iodeto de propídeo e Anexina V-FICT para análise da morte celular por apoptose em células Aag2 expostas ao etoposídeo (6,18, 24 e 48 horas). ....	145
<b>Figura 41.</b> Histogramas de ciclo celular obtidos por citometria das células Aag2 expostas ao inibidor etoposídeo por 6, 18, 36 e 48 horas.....	150
<b>Figura 42.</b> Perfil de atividade de decatenação promovida pela DNA topoisomerase II em diferentes concentrações de proteínas nucleares de células Aag2. ....	151
<b>Figura 43.</b> Perfil de atividade de decatenação do kDNA em diferentes concentrações de ATP..	152
<b>Figura 44.</b> Perfil de atividade de decatenação de kDNA na presença do inibidor etoposídeo. ....	154

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Percentual de sobrevivência das larvas de <i>Ae. aegypti</i> no 10º dia de bioensaio com etoposídeo (VP-16-213). .....	121
<b>Tabela 2.</b> Valores de IC <sub>50</sub> médio em µM utilizando o ensaio de MTT para células Aag2 tratadas com etoposídeo (VP-16-213).....	128

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> DNA topoisomerasas: Classes e subclasses e exemplos representativos. ....	44
<b>Quadro 2.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados. ....	66
<b>Quadro 3.</b> Soluções utilizadas na hibridização in situ.....	74
<b>Quadro 4.</b> Validação do modelo construído e refinado por modelagem comparativa.....	100
<b>Quadro 5.</b> Valores de Z-score, obtidos no servidor ProSA-Web. ....	102
<b>Quadro 6.</b> Valores de RMSD em dois volumes de sítio de ligação para a interação do inibidor etoposídeo com a enzima DNA topoisomerase II- $\beta$ humana, no procedimento de redocking. ....	107
<b>Quadro 7.</b> Resíduos de aminoácidos que realizam interações com o inibidor etoposídeo. ....	110
<b>Quadro 8.</b> Alinhamento dos resíduos em posições homólogas das enzimas AeTop2 e Top2- $\beta$ humana que realizam interações com o inibidor etoposídeo. ....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AeTop2 – Enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*
- ATP– Adenosina 5´-trifosfato;
- BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
- cDNA – DNA complementar
- Cq – Ciclo de quantificação
- DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindol
- DEPC – Dietilpirocarbonato
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxiribonucleico
- DNase – Desoxirribonuclease
- dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfatado
- DO – Densidade Óptica
- DSBs – Quebras de fita dupla do DNA (do inglês *Double-Strand-Breaks*)
- DTT – Ditioneitol
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- g – força gravitacional
- HyB – Tampão de hibridização (do inglês *Hybridization buffer*)
- PBS – Tampão salino fosfato (do inglês *Phosphate-buffered saline*)
- IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
- kb – Kilobases
- kDa –Kilodalton
- kDNA – DNA do cinetoplasto
- mRNA – RNA mensageiro
- MTT – Brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
- NBT– Nitro blue tetrazolium
- NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (Do Inglês *National Center for Biotechnology Information*)
- NLS – Sinal de localização nuclear (do inglês *Nuclear Localization Signal*)
- pb – Pares de base
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDB – Banco de dados de proteínas (do inglês *Protein Data Bank*)

PFA – Paraformaldeído

PI – Iodeto de propídeo

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

qPCR – PCR quantitativo (em tempo real)

RNA – Ácido ribonucléico

RNAse – Ribonuclease

RPS7 – Gene da proteína ribossomal S7

RT-qPCR – PCR quantitativo precedido por transcrição reversa

T<sub>m</sub> – Temperatura teórica em que 50% das moléculas de um determinado DNA encontram-se como fita simple e 50% como fita dupla.

Top2ccs – Complexo enzima-DNA (do inglês *Top2 closed complex*)

TOPRIM – Domínio topoisomerase-primase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	24
1.1 O mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	24
1.1.1 Aspectos gerais do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	24
1.1.2 Epidemiologia do <i>Aedes aegypti</i> e das principais viroses associadas .....	30
1.1.3 Febre amarela.....	31
1.1.4 Dengue .....	32
1.1.5 A infecção pelo vírus Zika .....	34
1.1.6 Febre chikungunya.....	35
1.1.7 Febre Mayaro.....	36
1.1.8 Estratégias de controle do vetor <i>Aedes aegypti</i> .....	37
1.2 As Topoisomerases.....	40
1.2.1 Visão geral das DNA topoisomerases .....	40
1.2.3 DNA topoisomerases do tipo I.....	46
1.2.4 DNA topoisomerases do tipo II.....	47
1.2.5 DNA topoisomerases do tipo IIA .....	48
1.2.6 Ciclo catalítico das DNA topoisomerases do tipo IIA.....	51
1.2.7 Ação biológica das DNA topoisomerases na célula.....	53
1.2.8 Função das topoisomerases II na replicação .....	53
1.2.9 Função da DNA topoisomerase II na transcrição .....	56
1.2.10 Inibidores de DNA topoisomerases do tipo II.....	57
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	63
2.1 Objetivo geral .....	63
2.2 Objetivos Específicos .....	63
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	64
3.1 Manutenção da colônia de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	64
3.2 Bioensaio de atividade larvívora com inibidor etoposídeo .....	64
3.2.1 Curva de sobrevivência/mortalidade .....	64
3.2.2 Análise morfológica das larvas expostas ao etoposídeo .....	65
3.3 Análise de expressão relativa por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) .....	66
3.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	67
3.3.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para RT-qPCR .....	66
3.3.3 Determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores.....	67
3.3.4 RT-qPCR para avaliação da expressão relativa.....	68
3.4 Hibridização <i>in situ</i> .....	70
3.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores .....	70

3.4.2	Preparo da sonda de RNA .....	70
3.4.3	Preparo do tecido e reação de hibridização <i>in situ</i> .....	71
3.5	Cultura de células embrionárias do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Aag2) .....	74
3.6	Métodos colorimétricos.....	75
3.6.1	Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	75
3.6.2	Ensaio de proliferação celular (cristal violeta) .....	76
3.7	Análise morfológica das células Aag2 .....	78
3.7.1	Marcação com DAPI .....	78
3.7.2	Histoquímica com hematoxilina e eosina .....	78
3.8	Análise do ciclo celular e apoptose nas células Aag2.....	79
3.8.1	Marcação celular com anexina-V e iodeto de propídeo (PI) .....	79
3.8.2	Ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose.....	80
3.8.3	Citometria de fluxo .....	81
3.9	Ensaio da atividade enzimática da DNA topoisomerase do tipo II em células Aag2 .....	83
3.9.1	Extração de proteínas nucleares de células Aag2.....	83
3.9.2	Ensaio de decatenação de kDNA como forma de determinar especificamente a atividade de DNA topoisomerasas do tipo II .....	84
3.9.3	Padronização e análise do perfil de decatenação do kDNA pelo extrato nuclear de células Aag2 .....	86
3.10	Filogenia molecular .....	87
3.10.1	Alinhamento múltiplo.....	87
3.10.2	Método de distância ( <i>Neighbour-Joining</i> ).....	87
3.10.3	Método de máxima parcimônia .....	88
3.11	Modelagem por homologia .....	89
3.11.1	Bancos de dados utilizados.....	89
3.11.2	Alinhamento de sequências e modelagem comparativa.....	89
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>93</b>
4.1	Identificação do gene da enzima DNA topoisomerase II de <i>Aedes aegypti</i> .....	93
4.1.1	Identificação do gene de uma DNA topoisomerase II de <i>Ae. aegypti</i> .....	93
4.1.2	Reconstrução filogenética .....	94
4.2	Modelagem comparativa da enzima AeTop2.....	97
4.2.1	Construção, otimização e validação do modelo da enzima AeTop2.....	97
4.2.2	Estudos de <i>docking</i> molecular com o inibidor etoposídeo .....	105
4.3	Estudo da expressão gênica da DNA topoisomerase II de <i>Ae. aegypti</i> .....	113
4.3.1	Perfil de expressão gênica do mRNA da enzima AeTop2 ao longo das fases juvenis do ciclo de vida mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	113

4.3.2 Perfil de expressão gênica do mRNA da enzima AeTop2 em fêmeas e nos órgãos do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .....	114
4.3.3 Hibridização <i>in situ</i> do mRNA da enzima AeTop2 no ovário de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> .....	116
4.4 Efeitos do inibidor etoposídeo sobre as larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	119
4.4.1 Análise da sobrevivência das larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas ao inibidor etoposídeo (VP-16-213): bioensaio de atividade larvicida .....	119
4.4.2 Análise da morfologia das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao etoposídeo: bioensaio de atividade larvicida .....	122
4.5 Efeitos do inibidor da enzima DNA topoisomerase II sobre as células de origem embrionária Aag2 de <i>Aedes aegypti</i> .....	127
4.5.1 Perfil de viabilidade celular das células Aag2 expostas ao inibidor etoposídeo: viabilidade e proliferação celular .....	127
4.5.2 Análise morfológica das células Aag2 expostas ao etoposídeo por histoquímica com hematoxilina e eosina (HE) .....	133
4.5.3 Análise das alterações morfológicas nucleares causadas pelo inibidor etoposídeo nas células Aag2 .....	137
4.6 Avaliação da morte por apoptose em células Aag2 expostas ao inibidor etoposídeo .....	141
4.6.1 Fragmentação internucleossômica do DNA .....	141
4.6.2 Marcação das células Aag2 com Anexina V-FICT e iodeto de propídeo .....	142
4.7 Avaliação do ciclo celular de células Aag2 utilizando citometria de fluxo .....	146
4.8 Ensaio de atividade da DNA topoisomerase II: decatenação do kDNA .....	150
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	155
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	179
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	181



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

#### 1.1.1 Aspectos gerais do mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um inseto classificado na ordem Diptera, família Culicidae e subfamília Culicinae. Os dípteros são popularmente conhecidos como mosquitos, muriçocas ou carapanãs. Como características gerais dos mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*, seus membros possuem porte pequeno e corpo delgado, são holometábolos com metamorfose completa no seu ciclo de desenvolvimento, no qual passam pelas fases de ovo, larva (4 instares), pupa e adulto (SERVICE, 1993), como ilustrado na figura 1. Um aspecto importante em relação ao ciclo biológico desses mosquitos é que a duração das fases depende de condições inerentes ao ambiente, como temperatura e a exposição a períodos chuvosos. Estes insetos são normalmente encontrados em ambientes urbanos e periurbanos e, devido a isso, as fêmeas do *Ae. aegypti* apresentam o hábito de depositar seus ovos em copos, garrafas, pneus, tonéis e outros recipientes que possam vir a acumular água, sendo assim considerados criadouros artificiais. Podem ainda realizar a oviposição em plantas (como bromélias e bambus), valões, entre outros locais, os chamados criadouros naturais (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

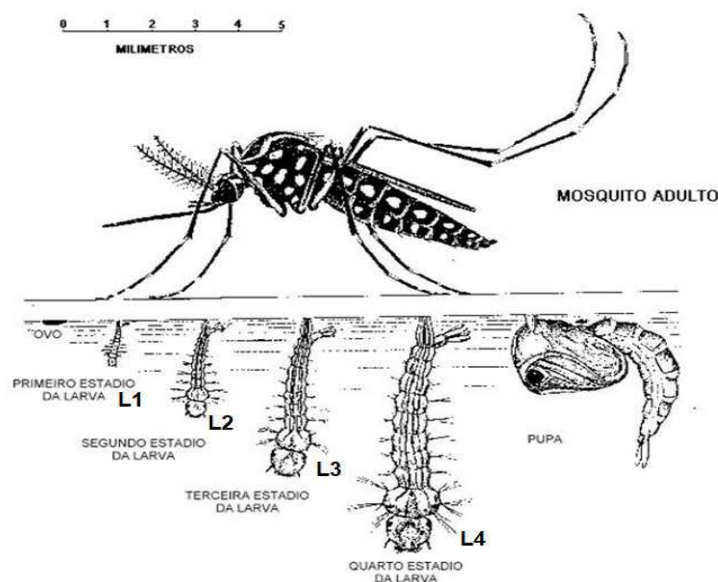


Figura 1. Representação do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*: Ovo, larva, pupa e adulto. Fonte: BRASIL, 2008.

Os culicídeos adultos são insetos pequenos que medem em torno de 3 a 6 mm de comprimento (FORATTINI, 2002) e, como todo inseto, possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdome (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A cabeça é globosa e composta, na parte ântero-lateral, principalmente pelos olhos. Também estão presentes na cabeça outros órgãos sensoriais, como as antenas, os palpos e o aparelho bucal. No tórax encontram-se as patas e asas, que são os apêndices responsáveis pela locomoção do inseto. Grande parte dos órgãos internos do inseto (aparelho reprodutor, digestivo e excretor) está contida na região do abdome (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O *Ae. aegypti* adulto apresenta algumas características morfológicas que o tornam um inseto de fácil identificação, primeiramente os indivíduos dessa espécie possuem um tórax recoberto por escamas claras e escuras, sendo que a olho nu essas escamas se destacam com aparência de “lira”. Outra característica marcante é a presença, na região posterior à cabeça e nos seguimentos abdominais, de manchas brancas que se alternam com manchas escuras. Estas manchas podem ser apresentadas como anéis brancos que se contrastam com a cor escura na base de cada pata (FORATTINI, 2002; REY, 2008).

Os machos e fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* podem ser diferenciados pelo aspecto flagelar da antena, que diz respeito à forma e volume que as cerdas estão implantadas nos segmentos. Os machos do mosquito apresentam cerdas mais longas e volumosas nas antenas, quando comparados com as fêmeas. Com base nessa caracterização, as antenas das fêmeas são denominadas pilosas e as dos machos plumosas. Outra diferença observa-se no tamanho, pelo fato das fêmeas serem visualmente maiores que os machos (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Em relação aos hábitos alimentares, tanto os machos quanto as fêmeas podem se alimentar do néctar e da seiva de plantas para obtenção de carboidratos necessários à manutenção do metabolismo energético e à sobrevivência desses insetos. Porém somente as fêmeas do *Ae. aegypti* são hematófagas (REY, 2008) e o repasto sanguíneo é relacionado principalmente ao desenvolvimento dos ovos (EDMAN et al., 1992; CONSOLI, 1982). Os aparelhos bucais desses insetos estão fisiologicamente e estruturalmente adaptados a cada forma de captação de alimento. Enquanto nos machos o aparelho bucal é reduzido e sem capacidade de romper uma camada resistente como à da pele humana (GUIMARÃES, 2001; FORATTINI, 2002), nas fêmeas o aparelho bucal

se apresenta alongado, característico do hábito picador sugador (FORATTINI, 2002). A saliva que é inoculada por ocasião da picada da fêmea possui também a particularidade de conter substâncias anticoagulantes em sua composição (CALVO et al., 2007; WATANABE et al., 2010). Geralmente a sucção ocorre diretamente de um capilar sanguíneo, fazendo com que o processo completo do repasto sanguíneo dure cerca de três minutos (CONSOLI; WILLIAMS, 1981). O volume do sangue ingerido por uma fêmea de *Ae. aegypti* durante o repasto sanguíneo varia de 1,5 a 4,2 mm<sup>3</sup> (KNAUS et al., 1993).

O hábito hematofágico das fêmeas de *Ae. aegypti* (figura 2) é restrito ao período diurno, sendo que geralmente apresentam maior atividade no repasto sanguíneo ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino. Porém, os seres humanos, bem como os animais domésticos, podem sofrer picadas em qualquer momento do dia e mesmo ocasionalmente à noite, de uma forma mais oportunista, em casos onde o homem se aproxima dos locais de abrigo dos mosquitos. O hábito diurno também é observado nos machos, pois estes seguem as fêmeas até seus abrigos domiciliares ou peridomiciliares, para buscar por substâncias açucaradas e efetuar a cópula (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



**Figura 2. Fêmea de *Aedes aegypti* se alimentando de sangue humano.** Fonte: Foto de James Gathany/Flickr CC BY 2.0.

Os mosquitos adultos vivem em média seis semanas, na natureza a longevidade dessa fase está relacionada a fatores específicos, que podem ser intrínsecos (nutrição larval, metabolismo e idade fisiológica) e extrínsecos (temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes) (CONSOLI, 1982). Como mencionado anteriormente, no estágio adulto os mosquitos *Ae. aegypti* utilizam recipientes artificiais como criadouros

preferenciais para postura *dos* ovos, o que inclui tanto os que são abandonados pelo homem a céu aberto e acumulam água das chuvas, como os que armazenam água para utilização doméstica, como tanques e caixas d'água. Hoje sabe-se que a proliferação das larvas do mosquito *Ae. aegypti* não está restrita apenas à água limpa armazenada nos criadouros, podendo também haver a proliferação em ambientes sujos ou poluídos e até mesmo na água salgada, em condições naturais (ARDUINO; MARQUES; SERPA, 2010). No ano de 2010, um estudo coordenado pela Superintendência de Controle de Endemias de São Paulo (SUCEN), mostrou que no litoral de São Sebastião, norte do estado, havia presença de larvas de *Ae. aegypti* em mais de trezentos pontos com algum tipo de resíduo químico, como restos de tinta ou óleo, além de criadouros com teor considerável de salinidade.

Arduino, Marques e Serpa (2010) demonstram assim o quanto ações preventivas no espaço ocupado pelo homem, assim como políticas públicas envolvendo saneamento básico e saúde, são de suma importância para o controle da expansão do vetor *Ae. aegypti* para novos nichos.

Na estação chuvosa as populações de *Ae. aegypti* conseguem atingir níveis elevados e conseqüentemente a transmissão de patógenos por esse vetor se intensifica a índices alarmantes (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). No caso da transmissão do vírus da dengue, por exemplo, sabe-se que as fêmeas, uma vez infectadas, estão aptas a transmitir o vírus até o final da sua vida. Estima-se que nesse pequeno intervalo de semanas, uma única fêmea de *Ae. aegypti* possa infectar até 300 pessoas, em ambientes domiciliares e peridomiciliares (McBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

Outra estratégia reprodutiva bem sucedida e que contribui para a alta proliferação do mosquito *Ae. aegypti* é a adoção da estenogamia, na qual o acasalamento é realizado em espaços minúsculos, com os mosquitos pousados, sobre superfícies ou mesmo durante o voo (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A cópula quase sempre ocorre antes da alimentação sanguínea pelas fêmeas, o que garante a produção de um número alto de ovos. Após a cópula, os espermatozoides são armazenados nas espermatecas da fêmea, sendo utilizados à medida que houver a fecundação dos ovócitos em períodos de postura (CLEMENTS, 1963; ANDREADIS; HALL, 1980).

Portanto, como os espermatozoides são liberados pouco a pouco, basta um ciclo gonotrófico para promover múltiplas oviposições. Outra peculiaridade no comportamento reprodutivo desses mosquitos é a realização da postura dos ovos de forma fracionada (YOSHIOKA et al., 2012), uma vez que as fêmeas interrompem a oviposição e passam a buscar por novos locais para retomar ou reiniciar a postura dos ovos. Acredita-se que essa estratégia proporcione uma chance maior de dispersão da sua prole (REITER; 2007).

No momento da postura os ovos do mosquito *Ae. aegypti* têm coloração branca, passando por um rápido endurecimento e melanização nas primeiras 24 horas (BRASIL, 2001). Os ovos dessa espécie apresentam simetria bilateral e possuem um aspecto alongado (CHRISTOPHERS, 1960; CLEMENTS, 1963), medindo cerca de um milímetro de comprimento e 0,4 milímetros de largura (FORATTINI, 1962; BRASIL, 2001). Do ponto de vista anatômico, os ovos dessa espécie apresentam-se inicialmente revestidos por uma estrutura elástica, que se torna imediatamente rígida após a postura. Essa estrutura é denominada córion, também conhecida como casca do ovo. No ovo recém posto, o córion é formado por três camadas: uma fina membrana vitelínica interna (que cobre o vitelo, o núcleo e o citoplasma), o endocório (rígido e espesso) e o exocório (delgado e transparente), as duas últimas compondo o envoltório externo. Além de garantir a proteção mecânica do ovo, o córion também permite as trocas gasosas e reduz a perda de água nessa fase (FORATTINI, 2002). Ainda no córion, temos um orifício, denominado micrópila, que é o remanescente da região onde os espermatozoides realizam a fecundação dos ovócitos (CLEMENTS, 1992).

Em condições ambientais favoráveis, logo após sua postura na superfície da água, os embriões vão se desenvolver totalmente em até 62 horas e eclodir como larvas (CLEMENTS, 1992; FARNESI et al, 2009; VITAL., 2010). Porém, quando em condições adversas, como na ausência de água, os embriões entram em diapausa, um estado de quiescência que leva à suspensão temporária da eclosão dos ovos após o término do desenvolvimento embrionário. Os ovos de *Ae. aegypti* nesse estado resistem a dessecação e podem permanecer viáveis por longos períodos, até que entrem em contato novamente com água eclodam (FORATTINI, 2002; LACOUR et al., 2014).

A eclosão das larvas é auxiliada pela pressão entre um “dente” quitinoso, localizado dorsalmente na cabeça da larva do 1º instar, e o córion do ovo. Outros fatores, como o ingurgitamento da larva e seus movimentos pulsáteis também auxiliam na eclosão (CLEMENTS, 1963; FORATTINI, 1962). Embora aquáticas, as larvas dependem do ar atmosférico para respirar e para tal atividade necessitam constantemente chegar até a superfície da água (CLEMENTS, 1963). As larvas do mosquito são desprovidas de apêndices locomotores articulados, mas possuem cerdas que, associadas aos movimentos pulsáteis do corpo, auxiliam no seu deslocamento.

As larvas de *Ae. aegypti* possuem um aparelho bucal do tipo mastigador raspador, composto pelas seguintes peças bucais: epifaringe, hipofaringe, mandíbula, maxilas e lábio. Na face ventral da cabeça estão presentes estruturas denominadas escovas, descritas como orais ou palatais. É através do movimento dessas escovas que ocorre à formação de correntes hídricas que trazem partículas do meio até o aparelho bucal da larva, garantindo assim a alimentação neste período (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Nessa fase as larvas de *Ae. aegypti* alimentam-se basicamente de partículas de matéria orgânica e do micropâncton presente em seus habitats naturais, que consiste de algas, bactérias, esporos de fungos e outros seres microscópicos (CHRISTOPHERS, 1960). A fase larval se completa no período de 10 dias, passando pelos quatro estágios (L1, L2, L2, L4) até o estágio de pupa (figura 1) (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As pupas de *Ae. aegypti* têm formato característico de vírgula e podem demonstrar movimento ou permanecerem paradas (FORATTINI, 2002). Esta fase não apresenta mandíbulas funcionais e é, portanto, um período com ausência de alimentação (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O corpo da pupa de *Ae. aegypti* possui coloração clara, semelhante a larvas recém-formadas, e escurece à medida que se aproxima a emergência do adulto (CONSOLI; LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O corpo da pupa está dividido em duas porções: o cefalotórax (cabeça unida ao tórax), que apresenta forma globosa, e o abdome, com 10 segmentos identificáveis e que, através dos seus movimentos rápidos, promove sua locomoção (FORATTINI, 2002).

Mesmo sabendo que é a estágio adulto do mosquito que transmite as arboviroses, não podemos desconsiderar características específicas das formas imaturas (ovo, larva e pupa), não menos importantes para um melhor entendimento sobre o os

processos que envolvem a adaptação e as possíveis relações do vetor *Ae. aegypti* com os seres humanos e seu ambiente. De fato, os estágios juvenis são justamente os alvos de muitas das estratégias empregadas para o controle da proliferação dessa espécie.

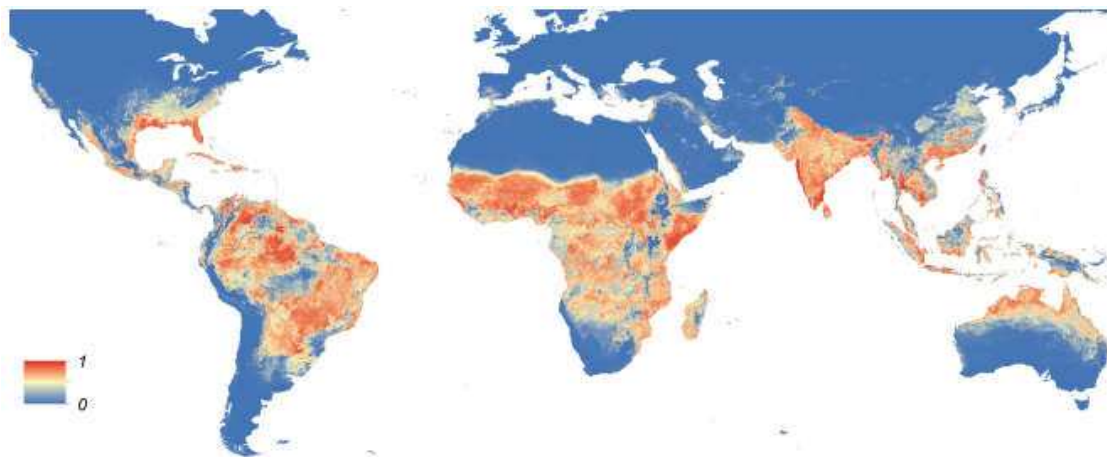
### 1.1.2 Epidemiologia do *Aedes aegypti* e das principais viroses associadas

Atualmente a exposição à população humana ao mosquito *Aedes aegypti* é considerada um dos principais problemas de saúde pública nos países tropicais, devido ao seu papel vetorial na transmissão de arboviroses como a dengue, Zika e as febres amarela e chikungunya.

O *Ae. aegypti* é o vetor associado às epidemias de dengue e outras arboviroses nos centros urbanos de diversos países como mostra o mapa global de distribuição do vetor (figura 3). Embora as arboviroses mencionadas possam ser transmitidas ao homem também pela espécie relacionada *Aedes albopictus*, esse último vetor tem importância menor no cenário epidemiológico mundial, pois é mais associado aos ciclos silvestres, rurais e periurbanos de transmissão (MOUSSON et al., 2005). O próprio *Ae. aegypti* possui duas subespécies reconhecidas: *Ae. aegypti aegypti* e *Ae. aegypti formosus*. O *Ae. aegypti aegypti* é a subespécie associada às epidemias urbanas de dengue ao redor do mundo, enquanto o *Ae. aegypti formosus* prefere hospedeiros não humanos e apresenta distribuição restrita a regiões silvestres da África subsaariana (MOUSSON et al., 2005; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018). Acredita-se que o *Ae. aegypti aegypti* atual surgiu na África a partir de subpopulações do *Ae. aegypti formosus*. Sua disseminação mundial teria ocorrido a partir do século XVI com a intensificação do comércio e tráfico de escravos entre África, Europa e as Américas (POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018). Com o passar dos séculos, os meios de transporte desenvolvidos pelo ser humano contribuíram também para intensificar a distribuição geográfica de formas adultas e juvenis do *Ae. aegypti aegypti*, que passou a habitar os centros urbanos de todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta (MOUSSON et al., 2005; KRAEMER et al., 2015; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018) (figura 3).

Acredita-se que a capacidade da subespécie *Ae. aegypti aegypti* de se desenvolver em corpos d'água de natureza e qualidade diversas, assim como de utilizar eficientemente os mais diversos tipos de reservatórios artificiais proporcionados pelo

ambiente urbano, tenham sido os principais fatores que favoreceram a disseminação mundial desse inseto e dos vírus por ele veiculados (NATAL, 2002; TAUIL, 2002). Ao longo do presente trabalho o termo *Ae. aegypti* estará se referindo a subespécie *Ae. aegypti aegypti*.



**Figura 3. Mapa global da distribuição prevista de *Aedes aegypti*:** o mapa representa a probabilidade de ocorrência (de azul para 0 e vermelho para 1). Resolução espacial de 5 km × 5 km. Fonte: KRAEMER et al., 2015.

As principais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* são abordadas a seguir:

### 1.1.3 Febre amarela

O vírus da febre amarela pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviridae*. A sua estrutura viral é formada por um capsídeo icosaédrico, contendo um o genoma composto por RNA fita simples de polaridade positiva (CHAMBERS et al., 1990).

A febre amarela é uma doença reemergente infecciosa, não contagiosa, com estado febril aguda, de gravidade variável (VASCONCELOS, 2003). A transmissão geralmente ocorre durante estações chuvosas, tendo o mosquito *Aedes aegypti* como um dos seus principais vetores. São reconhecidos três ciclos de transmissão para a febre amarela: o urbano (formado pelo mosquito e o ser humano), o silvestre (formado por mosquitos e primatas silvestres, atingindo incidentalmente o ser humano) e o ciclo intermediário (no qual seres humanos se contaminam no ambiente silvestre e trazem a doença para os centros urbanos) (JAVELLE; GAUTRET; RAOUL, 2018; KAUL et al., 2018). É importante mencionar que no ciclo silvestre os mosquitos do gênero



*Haemagogus* são os principais vetores na transmissão da febre amarela (CHIPPAUX; CHIPPAUX, 2018).

Uma vez adquirido, o vírus tem a capacidade de se espalhar de forma rápida por vários órgãos do corpo humano. O fígado é sempre o órgão mais afetado pela febre amarela, levando a icterícia profunda, característica da doença (BARRET, 2018; FARIA et al., 2018). A febre amarela pode ocorrer em pessoas de todas as idades e etnias, embora geralmente a maior taxa de mortalidade seja observada em bebês e idosos, pelo comprometimento imunológico nessa faixa etária (CHIPPAUX; CHIPPAUX, 2018).

Em meados do século XX, em virtude da campanha nacional de erradicação do vetor *Ae. aegypti*, a febre amarela teve sua transmissão controlada em todo o Brasil (MAGALHÃES, 2016). Contudo, a partir da década de 1970, as populações de *Ae. aegypti* rapidamente se restabeleceram no território nacional (KOTSAKIOZI et al., 2017). Nos últimos anos a febre amarela voltou a ganhar destaque no monitoramento epidemiológico do Brasil como arbovirose de importância na saúde pública em áreas não endêmicas. Os dados do monitoramento epidemiológico mantêm a situação dessa doença sob alerta eminente. Entre julho de 2017 e junho de 2018 foram confirmados 1.376 casos de febre amarela no país, com 483 óbitos, o que motivou a ampliação da vacinação para 4.469 municípios desde o final de 2017 (BRASIL, 2018a).

O Brasil registrou duas primeiras ondas de febre amarela nos períodos sazonais de 2016/2017 e 2017/2018 em Minas Gerais (BRASIL, 2018a). Um dos aspectos mais agudos é que doença tem a letalidade alta, em torno de 33%, o que torna a situação ainda mais grave (CHIPPAUX; CHIPPAUX, 2018; BRASIL, 2018a). A reemergência dos surtos de epidemia da febre amarela é relacionada à redução na cobertura vacinal nas regiões mais afetadas, uma vez que a vacinação é o meio mais prático e confiável de controle da febre amarela, tanto para pessoas que vivem ou para aquelas que viajam para áreas endêmicas (BRASIL, 2003).

#### **1.1.4 Dengue**

A dengue é uma doença infecciosa, febril, que é causada por um vírus de RNA de fita simples da família Flaviviridae. Até o momento quatro sorotipos do vírus já foram identificados, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (POLLETT et al., 2018). Embora

cada sorotipo desencadeie manifestações clínicas semelhantes na doença, estes são geneticamente e antigenicamente distintos (MUSTAFA et al., 2015). Após se infectar com o vírus da dengue, um indivíduo adquire proteção imunológica contra o mesmo sorotipo, possivelmente pelo resto da vida (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994). A transmissão de todos os sorotipos aos humanos se dá pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, principalmente o *Ae. aegypti* no Brasil, embora outros vetores possam transmitir esses vírus (BRASIL, 2009b). Uma vez infectado, o mosquito *Ae. aegypti* poderá realizar a transmissão do vírus até o fim da sua vida, que compreende um período de aproximadamente 6 semanas (BRASIL, 2009a).

Nos seres humanos é relatado que as infecções pelos vírus DENV causam uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde infecções praticamente assintomáticas, passando pela presença de dores nas articulações, febre, erupções cutâneas ou outros sintomas mais amenos, até outros mais severos, como a síndrome do choque da dengue ou a dengue hemorrágica, que podem ser fatais (BRASIL, 2002)

Bhatt e colaboradores (2013) Estimam que aproximadamente 390 milhões de infecções por vírus DENV ocorram anualmente em todo mundo das quais cerca de 96 milhões se manifestam clinicamente. A doença é considerada endêmica em mais de 100 países, principalmente de clima tropical e subtropical. Neste contexto, percebemos a vulnerabilidade do Brasil, que vem apresentando uma série de epidemias de dengue a partir de 1986 (BARRETO et al., 2011). Nos registros epidemiológicos de doenças infecciosas nacionais, pode-se verificar que a dengue se destaca por apresentar um crescimento gradual ao longo dos últimos anos. Em 2016, por exemplo, foram notificados 1.487.924 casos prováveis de dengue, sendo que a região Sudeste foi a que apresentou o maior número de casos prováveis (855.425 casos; 57,5%) quando comparando com outras regiões do país (21,7% no Nordeste, 13,2% no Centro-Oeste, 4,9% no Sul e 2,5% no Norte) (BRASIL, 2016). Já em 2018, a região Centro-Oeste passou a apresentar o maior número de casos prováveis (80.170 casos; 36,3%), em relação às demais regiões geográficas do país (28,5% no Nordeste, 28,1% no Sudeste 6,0% no Norte e 1,1% no Sul). Diante da magnitude dos dados epidemiológicos, da gravidade da doença e da frequência de surtos e epidemias, é nítido que a situação da dengue no Brasil não se

encontra controlada, o que justifica investimentos em novas abordagens de tratamento, no desenvolvimento de vacinas e no controle vetorial dos mosquitos.

### 1.1.5 A infecção pelo vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) é também um vírus de RNA fita simples positiva pertencente à família Flaviridae (gênero Flavivírus) (HAYES, 2009), havendo sido isolado pela primeira vez em 1947, em um macaco rhesus sentinela, utilizado como cobaia de zika na floresta em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MINER; DIAMOND, 2017). No Brasil é considerado um patógeno emergente de grande importância médica desde o surto registrado em 2015 (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Atualmente, a infecção pelo vírus Zika se tornou uma ameaça à saúde humana nas Américas, Ásia e África, com complicações severas que incluem microcefalia congênita e a síndrome de Guillain-Barré (MINER; DIAMOND, 2017).

A transmissão do vírus Zika ocorre principalmente em um ciclo urbano entre seres humanos e mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, sendo o *Ae. aegypti* o vetor com maior relevância no Brasil (PETERSEN et al., 2016).

Os sintomas clínicos da infecção pelo vírus Zika podem ser facilmente confundidos com os sintomas induzidos por outras arboviroses, principalmente a dengue. Febre, erupções na pele, conjuntivite, mialgia, mal-estar e cefaléias são os principais sintomas, que geralmente duram de 2 a 7 dias (MINER; DIAMOND, 2017).

No Brasil, desde o surto de 2015 as autoridades sanitárias tem se mantido em alerta quanto ao monitoramento de casos da doença. Em 2018 foram notificados 7.544 casos prováveis de infecção pelo vírus Zika no país, com taxa de incidência de 3,6 casos/100 mil habitantes. Dentre as regiões, a Sudeste foi a que apresentou o maior número de casos prováveis (2.779 casos; 36,8%) em relação ao restante do país (29% no Nordeste, 21,2% no Centro-Oeste, 12,5% no Norte e 0,5% no Sul) (BRASIL, 2018b).

Acredita-se que, pela notável semelhança genética entre os vírus da dengue e Zika, os conhecimentos gerados na descoberta de novos tratamentos para a dengue possam também ser ampliados ou adaptados para o tratamento de infecções pelo vírus Zika (WEAVER et al., 2016). Com relação à prevenção, apesar dos grandes esforços de

pesquisa, a vacina para esse patógeno ainda é indisponível e deverá ainda aguardar até que a biologia do vírus Zika seja melhor compreendida.

Num âmbito geral, a melhor perspectiva para impedir a propagação do vírus Zika permanece sendo o controle do vetor *Ae. aegypti*, na tentativa de prevenir o contato entre o vetor e seres humanos (WEAVER et al. 2016).

### **1.1.6 Febre chikungunya**

A febre chikungunya é uma doença infecciosa emergente, causada pelo vírus chikungunya, um alfavírus com genoma de RNA de fita simples positiva (gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*). A infecção foi descrita pela primeira vez em um surto no ano de 1952, na região onde fica atualmente a Tanzânia (HORWOOD; BUCHY, 2015).

Em seres humanos a transmissão do vírus ocorre através da picada de mosquitos vetores das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectados (HORWOOD; BUCHY, 2015). Ainda que a transmissão direta entre humanos não tenha sido demonstrada, há de se considerar a possibilidade de transmissão vertical durante a gestação (VOUGA et al., 2019). O início súbito da febre chikungunya ocorre em um período médio de 2 a 4 dias após a picada. Os sintomas associados principais são febre alta, artralgia grave e mialgia, cefaléia forte e erupções cutâneas (HORWOOD; BUCHY, 2015).

A circulação do vírus foi identificada pela primeira vez no Brasil em 2014 (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015) e nos últimos anos a ocorrência do vírus chikungunya já abrange todo o país. Os dados epidemiológicos de 2018 revelam o registro de 80.940 casos prováveis de febre de chikungunya no país. A região Sudeste foi a que apresentou o maior número de casos prováveis de febre chikungunya (48.344 casos; 59,7%) em relação ao restante do país (16,9% no Centro-Oeste, 13,3% no Nordeste, 9,7% no Norte e 0,3% no Sul) (BRASIL, 2018b).

### 1.1.7 Febre Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV), agente etiológico da febre Mayaro, é um arbovírus vírus com genoma de RNA de fita positiva, pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, assim como o vírus chikungunya (KING et al., 2011).

Menos conhecido que os demais arbovírus discutidos acima, o vírus Mayaro é descrito como um patógeno zoonótico, pois tem circulação silvestre e rural na América do Sul tropical e seu ciclo envolve o mosquito *Haemagogus janthinomys* como vetor e primatas não humanos e aves, como hospedeiros vertebrados. Em Humanos pode apresentar alta viremia, a transmissão experimental já foi demonstrada em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*. e *Ae. scapularis* podendo constituir um risco para saúde pública em centros urbanos. Os casos de doença no homem são esporádicos e acidentais, na maioria, geralmente afetando pessoas que trabalham ou residem em áreas próximas a florestas tropicais úmidas (MUÑOZ; NAVARRO, 2012).

As manifestações clínicas da febre Mayaro consistem em uma fase aguda onde podem ocorrer sintomas como febre abrupta, artralgia e exantema maculopular, frequentemente associado a sangramento. Segue-se então uma fase subaguda da doença, onde podem ocorrer complicações neurológicas graves, febre intermitente, miocardite e até o óbito (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018).

Apesar de não receber tanta atenção se comparado as demais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*, o vírus Mayaro é conhecido desde a década de 1950. Já em abril de 1955, o Brasil protagonizou uma epidemia da doença. Entre 1966 e 2010, inquéritos sorológicos identificaram de forma recorrente traços da infecção pelo vírus Mayaro no país, o que colocou o Brasil como um dos países mais afetados por esse vírus nas últimas décadas. O Ministério da Saúde notificou 343 casos suspeitos de febre Mayaro entre dezembro de 2014 e janeiro de 2016, abrangendo as regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. Até o ano de 2017, apenas 70 diagnósticos foram confirmados, sendo a maioria na região Centro-Oeste e envolvendo moradores da área rural ou indivíduos que tiveram contato com essas áreas. Os dados epidemiológicos dos últimos três anos apontam para uma potencial urbanização da febre Mayaro no Brasil, uma vez que a propagação do agente infeccioso ocorre de forma discreta e que há a facilidade da

transmissão desse vírus pelo mosquito *Ae. aegypti* em ambientes domiciliares e peridomiciliares (BRASIL, 2019).

### **1.1.8 Estratégias de controle do vetor *Aedes aegypti***

O mosquito *Ae. aegypti* continua sendo considerado como o elo mais vulnerável na cadeia epidemiológica da transmissão das diferentes arboviroses discutidas acima. Conseqüentemente, o controle do vetor é o principal meio empregado na tentativa de reduzir o impacto dessas epidemias no mundo (WHO, 2009). Segundo o Grupo de Aconselhamento de Controle de Vetores (VCAG - *Vector Control Advisory Group*) da OMS, os métodos de controle do mosquito *Ae. aegypti* atualmente disponíveis ou em fase de desenvolvimento estão a) controle ambiental dos criadouros; b) armadilhas mecânicas; c) aplicação de inseticidas; d) técnicas de redução da fertilidade dos insetos, e) uso de insetos transgênicos e f) liberação de mosquitos com *Wolbachia* (ACHEE et al., 2019)

As estratégias de controle envolvem desde medidas preventivas, como a educação em saúde e a participação da população nas atividades que promovam a identificação e redução de criadouros de vetores no ambiente. O Ministério da Saúde recomenda às equipes regionais responsáveis pelo controle de vetores que sejam realizadas visitas a todos os pontos considerados de risco, para o combate do vetor nos estágios iniciais do desenvolvimento (BRASIL, 2009b). No que diz respeito ao uso de armadilhas, estas devem ser altamente sensíveis e específicas para a espécie-alvo, de forma a se tornarem ferramentas eficientes para eliminação de vetores. Nesta categoria, as armadilhas mais eficazes dependem de uma combinação de sinais atrativos ao mosquito, como luz, calor, umidade, dióxido de carbono e substâncias químicas sintéticas (SPITZEN; SMALLEGANGE; TAKKEN, 2008). Como exemplo de armadilha comercial destaca-se a *Mosquito Magnet Pro (MMpro, Mosquito Magnet Depot*, Flórida, EUA), que usa gás propano e proporciona uma armadilha economicamente acessível e de fácil implementação para o público em geral (ACHEE et al., 2019).

Os inseticidas podem ser classificados em químicos e biológicos. Os primeiros consistem de produtos usados para matar larvas (larvicidas) ou insetos adultos (adulticidas). Quanto ao seu mecanismo de ação, esses produtos podem ser

neurotóxicos, análogos de hormônio juvenil e inibidores de síntese de quitina (BRAGA; VALLE, 2007a). A aplicação de inseticidas para controle de mosquitos pode ser feita por meio de tratamento focal (aplicação em locais positivos para formas imaturas do mosquito, ou seja, ação larvicida), perifocal (aplicação em paredes externas de criadouros, apresentando ação residual- ação adulticida) e também por aspersão aeroespacial (BRASIL, 2001). Os inseticidas biológicos têm o potencial de constituir uma alternativa ambientalmente segura aos inseticidas químicos. Nessa categoria, os mais difundidos e estudados são compostos por bactérias *Bacillus thuringiensis*, que são usadas no controle de larvas de *Aedes*. Porém, a persistência de tais toxinas no ambiente, como é observado no uso de inseticidas químicos, pode favorecer a seleção e expansão de linhagens de insetos resistentes para esta classe de inseticidas (PARIS et al., 2011).

No controle biológico, fungos ascomicetos entomopatogênicos, em especial as espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, foram cogitados para o controle dos estágios de larva e adulto de *Ae. aegypti* (SCHOLTE et al., 2004). Porém, a otimização da formulação se mostrou crítica, uma vez que a longevidade dos fungos (duração da eficácia depois de aplicado) e até mesmo a variação da dose letal no mosquito não corresponderam aos parâmetros desejáveis para agentes biológicos de controle vetorial (ACHEE et al., 2019).

Atualmente as principais estratégias biológicas em fase de estudos para controle do mosquito *Ae. aegypti* são voltados ao emprego de bactérias endossimbióticas do gênero *Wolbachia* (MOREIRA et al., 2009; BIAN et al., 2010) e também à produção de insetos estéreis por meio de radiação (BALDACCHINO et al., 2015). A infecção dos mosquitos com *Wolbachia* promove a inibição da replicação e disseminação viral (MOREIRA et al., 2009; BIAN et al., 2010). Em outra abordagem, denominada como técnica do inseto estéril ou SIT (*Sterile Insect Technique*), machos estéreis são produzidos em laboratório através de baixa radiação ionizante (raios X ou gama), o que ainda permite sua capacidade de cópula e faz com que entrem em competição com machos selvagens pelas fêmeas. Assim como os avanços nos estudos de liberação de mosquitos com *Wolbachia* ao longo de quase uma década visam “encurtar” a vida do inseto (MOREIRA et al., 2009) outras abordagens visam a liberação de mosquitos com

baixa fertilidade no ambiente, com intuito de eliminar a próxima geração pelo acasalamento de insetos machos estéreis com insetos fêmeas selvagens o que levaria à produção de ovos potencialmente estéreis (ATYAME et al., 2016). No entanto, a aplicação da SIT em *Ae. aegypti* precisa ainda de melhoramentos para evitar danos somáticos, que podem resultar na redução da longevidade, em problemas com a atividade e com o vigor sexual dos machos estéreis (HELINSKI; PARKER; KNOLS, 2009). Os resultados com a SIT se mostraram muito promissores com relação ao mosquito *Ae. albopictus* (BELLINI et al., 2013), todavia os custos operacionais ainda são um empecilho para o estabelecimento de instalações de criação de machos estéreis em larga escala em países endêmicos (ACHEE et al., 2019).

Alguns estudos que envolvem manipulações genéticas no controle de mosquitos vetores seguem uma estratégia conhecida como *Gene Drive*, que consiste na introdução de indivíduos portando em seu genoma construções transgênicas com propriedade de invadir e de disseminar entre populações alvo através do acasalamento (BURT, 2003). Neste sentido, vários estudos focam em sistemas genéticos baseados em elementos de transposição para o mosquito *Ae. aegypti* (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002; CHEN; MATHUR; JAMES, 2008; BRACCO et al., 2007). Também foca-se no desenvolvimento de linhagens de mosquitos transgênicos contendo genes com atividade antiviral, direcionados à substituição de populações selvagens (FRANZ et al., 2006) ou genes dominantes letais para supressão populacional (PHUC, 2007). As estratégias atuais de *gene drive* envolvem a produção de linhagens de mosquitos geneticamente modificadas como sistema CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR-Associated Protein 9*) (GANTZ et al., 2015; HAMMOND et al., 2016). Nessas linhagens o elemento transgênico é inserido precisamente em um local estabelecido do genoma e sua transmissão passa a se tornar hereditária, mas com um padrão de herança não mendeliano, onde o *locus* geneticamente modificado converte o *locus* selvagem e torna a prole homozigótica para a construção (GANTZ et al., 2015; HAMMOND et al., 2016). Juntamente com o cassete que promove a propagação da construção genética CRISPR-Cas9, podem ser inseridos genes que reduzem a competência vetorial do *Ae. aegypti* (BUCHMAN et al., 2019).



O estudo dos aspectos relacionados à replicação do DNA e transcrição dos genes do mosquito *Ae. aegypti* podem contribuir para estratégias de controle que foquem na inibição desses eventos. A DNA Topoisomerase II é uma das principais enzimas envolvidas na replicação e segregação dos cromossomos, atuando também nos eventos de transcrição e recombinação gênica. A inibição desta enzima bloqueia a segregação dos cromossomos durante a divisão celular o avanço da forquilha de replicação, interferindo diretamente na progressão do ciclo celular.

## 1.2 As Topoisomerasas

### 1.2.1 Visão geral das DNA topoisomerasas

Basicamente, todo o DNA presente nas células é encontrado sob tensão helicoidal ou superenrolado. A estrutura superenovelada da molécula de DNA *in vivo* geralmente se encontra em um estado fechado, tal como verificamos em moléculas de DNA circulares de plasmídeos, nos genomas de muitos vírus ou ainda na maioria dos genomas bacterianos. Já nos genomas nucleares de organismos eucariotos, o DNA cromossomal assume formato de grandes alças. As extremidades dessas alças são estabilizadas por macromoléculas, o que garante que não girem sobre o eixo da própria hélice. Assim podemos assumir que a maioria das moléculas de DNA na natureza é encontrada no estado topológico denominado superenovelado ou superhelicoidizado (VOSBERG, 1985; WANG, 1996).

Os eventos envolvidos com o metabolismo do DNA (transcrição, replicação, reparo e recombinação) são fundamentais para garantir a sobrevivência dos organismos. Para que ocorram de forma eficiente, são necessárias mudanças temporárias na estrutura do DNA de forma que a molécula de ácido nucléico esteja acessível às proteínas envolvidas nesses processos. Neste aspecto, muitas vezes é primordial a separação permanente ou temporária das cadeias complementares da dupla hélice do DNA, o que implica na resolução de problemas topológicos decorrentes diretamente desses processos (WANG, 1996).

As enzimas responsáveis pelas alterações no estado topológico do DNA são classificadas como DNA topoisomerasas e estão presentes em todos os organismos vivos estudados até o momento. Essas enzimas pertencem a uma classe heterogênea de

proteínas, cujo papel é promover a interconversão entre topoisômeros de DNA ao realizar mudanças conformacionais que envolvem a clivagem e religação das fitas de DNA, sem alterar sua sequência de bases. Neste sentido, as DNA topoisomerases alteram basicamente o número de vezes que as cadeias se entrelaçam entre si e no espaço, o superenovelamento) (CHAMPOUX, 2001; DAS et al., 2004).

De forma resumida, as DNA topoisomerases criam quebras transitórias de fitas simples ou fita dupla no DNA e as reconectam sem alterar o número de ligação da molécula ( $Lk$ )<sup>1</sup>, possibilitando a continuidade e a conclusão de eventos associados ao DNA, como a replicação, reparo, transcrição gênica, recombinação e remodelamento da cromatina (GÓMEZ-EICHELMANN; CAMACHO-CARRANZA, 1995; CHAMPOUX, 2001). A separação das cadeias de DNA necessárias para que ocorram os processos de transcrição e replicação, assim tanto os eventos que envolvem a divisão perfeita das duas cópias idênticas de cada cromossomo eucariótico ou a promoção do alto grau de compactação da cromatina eucariótica envolvem ações críticas das DNA topoisomerases nas células (WANG, 2009).

Para que as enzimas RNA polimerases transcrevam os genes e para que as DNA polimerases repliquem os genomas, a separação das cadeias e a movimentação progressiva das “bolhas” de transcrição e das “forquilhas” de replicação ao longo da molécula de DNA é obrigatória. Devido à estrutura de hélice dupla do DNA e a restrição à rotação livre dessa molécula nas células, a separação das fitas leva a um superenovelamento do DNA nas regiões flangeadoras, onde as duas cadeias são separadas pelos complexos polimerase-helicase. Como resultados dessa ação, um superenrolamento positivo é gerado a jusante dos sítios de transcrição ou replicação e um superenrolamento negativo é gerado a montante desses sítios (LIU; WANG, 1987). Na

---

<sup>1</sup> O número de ligação ( $Lk$  - *Linking number*) é uma das principais características topológicas do DNA e corresponde ao número de voltas que uma cadeia do DNA passa por sobre a outra. O  $Lk$  consiste na soma de dois fatores: o número de torção ( $Tw$  - *Twisting number* - o número de voltas da dupla hélice) e o de supertorção ( $Wr$  - *Writhing number* - o número de vezes que o eixo longo da dupla hélice cruza sobre si próprio). O  $Lk$  é invariável para DNAs circulares (como cromossomos bacterianos) e DNAs topologicamente restritos (como cromossomos eucarióticos complexados a proteínas da cromatina e fixados no envoltório nuclear). Assim, para manter o  $Lk$  invariante, qualquer mudança em  $Tw$  é acompanhada por uma compensação em  $Wr$ . Alterações no  $Lk$  de um DNA só ocorrem mediante quebra de uma ou duas cadeias e rearranjo da dupla hélice, o que leva ao superenrolamento ou relaxamento do DNA (WATSON et al., 2015).

ausência da atividade das topoisomerasas do DNA, o superenrolamento positivo a jusante levaria ao bloqueio da transcrição e da replicação, terminando por impedir a movimentação das polimerases. Enquanto que o superenovelamento negativo promove a formação de inúmeras estruturas anormais do DNA, podendo incluir alças em D (*D loops*, formadas pela invasão de um duplex de DNA por um segmento complementar de DNA fita única), alças em R (*R loops*, formadas pelo anelamento contínuo de RNA com seu molde de DNA pela RNA polimerase a montante da forquilha), quartetos-G (que são quatro resíduos de guanina dispostos em uma estrutura plana) e a forma Z do DNA (nessa conformação a hélice dupla do DNA tem sua torção para esquerda). Dessa forma, todos os processos mencionados acima interferem no metabolismo normal do DNA (POMMIER et al., 2010). A replicação do DNA nos permite ter mais uma noção do quanto as ações das topoisomerasas do DNA são essenciais para manutenção e propagação da vida. Durante a replicação do DNA (que ocorre na fase S do ciclo celular em células eucarióticas) cada cromossomo é inteiramente replicado pela atividade das DNA polimerases, conforme discutido brevemente no parágrafo anterior. Mais adiante no tempo, durante a fase M do ciclo celular, as cromátides irmãs geradas pela replicação serão particionadas igualmente entre as células filhas. Entretanto, devido à estrutura em hélice dupla do DNA, o processo de replicação gera as progênies entrelaçadas (ou concatenadas) e as mesmas vão precisar ser resolvidas (ou decatenadas) com auxílio de topoisomerasas antes dos eventos da anáfase e da citocinese no ciclo celular. Além disso, os genomas circulares bacterianos e alguns genomas virais formam catenanos obrigatórios durante a replicação de seu DNA e, graças à ação das topoisomerasas, tais processos mantêm a eficiência e integridade da duplicação e propagação do genoma (POMMIER et al., 2010).

Com relação à organização e empacotamento da cromatina, por exemplo, sabemos que o DNA se compacta de tal modo que todo genoma de uma única célula humana (cerca de  $3 \times 10^9$  pares de base, o que corresponde a aproximadamente 1,8 metros de comprimento) precisa ser compartimentalizado de forma organizada em um núcleo com um diâmetro médio de 6  $\mu\text{m}$ . Podemos então dizer que a circunferência média de um núcleo celular de mamíferos é quase 100.000 vezes menor que o comprimento do genoma que precisa ser empacotado nele. Mesmo se tomarmos como exemplo um genoma circular e muito menor, como o da bactéria *Escherichia coli* ( $4,7 \times 10^6$  pares de

bases), vemos que esse DNA precisa ser empacotado no citoplasma de uma célula procariótica cuja circunferência média é cerca de 300 vezes menor. Tendo em vista essas proporções discrepantes, a compactação do material genético é viabilizada através da formação de estruturas densas, contendo o DNA em um estado de superenrolamento e organizado hierarquicamente em estruturas toroidais e alças, com a participação de proteínas auxiliares, como as histonas eucarióticas. Na manutenção da compactação do DNA, as enzimas topoisomerases evitam/aliviam a formação de tensão e nós (*knots*) na estrutura superenrolada ou super helicoidal do DNA (POMMIER et al., 2010).

De uma maneira geral, a atividade das DNA topoisomerases tem início com a promoção de uma quebra transitória de uma ou ambas as cadeias do DNA alvo. Esta quebra do DNA é acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transiente entre um resíduo de tirosina específico da topoisomerase (altamente conservado) em uma das extremidades da cadeia clivada. Considerando uma diferença fundamental no mecanismo básico de ação, temos duas classes de DNA topoisomerases: as do tipo I (Topo I), que realizam a quebra em apenas uma cadeia da hélice dupla de DNA por reação, e as do tipo II (Topo II) (quadro 1), que são capazes de promover a clivagem de duas cadeias do DNA por reação (VOSBERG, 1985; WANG, 1996). Ambos os tipos de topoisomerases ainda podem ser subdivididos em subclasses A e B, compartilhando aspectos mecânicos, embora variando em estrutura (WANG, 2002). Os procariotos tendem a ter uma organização mais simples do que a observada em metazoários, com apenas quatro topoisomerases descritas para *E. coli*, por exemplo. No entanto, muitas bactérias possuem duas enzimas do tipo IA (Topo I e Topo III) e duas enzimas do tipo IIA (DNA girase e Topo IV) (POMMIER et al., 2010).

**Quadro 1.** DNA topoisomerasas: Classes e subclasses e exemplos representativos.

CLASSIFICAÇÃO DAS CLASSES E SUBCLASSES DE DNA TOPOISOMERASES		
CLASSE	SUBCLASSE	DNA TOPOISOMERASES
TOPO I	IA	DNA topoisomerasas I e III bacterianas DNA topoisomerase III de levedura DNA topoisomerasas III $\alpha$ e III $\beta$ de <i>Drosophila melanogaster</i> DNA topoisomerasas III $\alpha$ e III $\beta$ de mamíferos
	IB	DNA topoisomerase I eucariótica DNA topoisomerase I mitocondrial de mamíferos DNA topoisomerase de poxvírus
	IC	DNA topoisomerase IC de <i>Methanococcus kandleri</i>
TOPO II	IIA	DNA girase bacteriana DNA topoisomerase IV bacteriana DNA topoisomerase do fago T4 DNA topoisomerase II de levedura DNA topoisomerase II de <i>Drosophila melanogaster</i> DNA topoisomerasas II $\alpha$ e II $\beta$ de mamíferos
	IIB	DNA topoisomerase VI de <i>Sulfolobus shibatae</i>

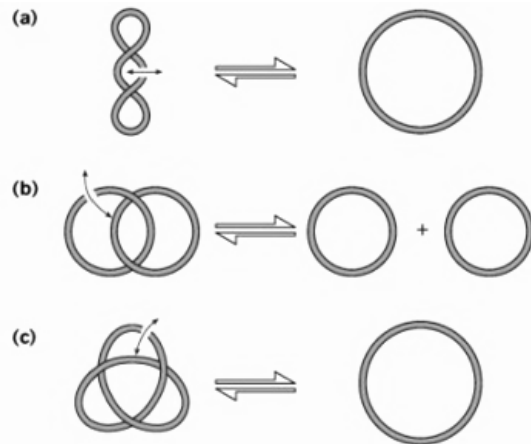
Fonte: Adaptado de Wang, 2002.

Os mecanismos de ação de algumas topoisomerasas requerem a presença de íons metálicos divalentes como cofatores para a reação de clivagem e religação do DNA, podendo ainda sua ação depender de ATP. Neste quesito as DNA topoisomerasas do tipo I não necessitam de ATP para promover a quebra e o relaxamento de moléculas de DNA sob tensão de superenrolamento. Em contrapartida, as enzimas DNA topoisomerasas do tipo II são dependentes de ATP para realização da clivagem de ambas as cadeias da dupla hélice de DNA, assim estas enzimas não só catalisam a passagem de segmentos de DNA justapostos aleatoriamente, mas controla a topologia dessa molécula, utilizando a energia da hidrólise de ATP para remover preferencialmente as ligações topológicas que fornecem barreiras à segregação do DNA (GÓMEZ-EICHELMANN; CAMACHO-CARRANZA, 1995).

O tamanho funcional dos complexos enzimáticos bacterianos e eucarióticos das DNA topoisomerasas são relativamente grandes, variando em torno de 70 kDa para complexos contendo as topoisomerasas do tipo I e 370-400 kDa para aqueles contendo

as enzimas do tipo II. Para fins de comparação, os tamanhos dos complexos de topoisomerase do tipo II são maiores que o tamanho de um nucleossomo, que é de aproximadamente 120 kDa sem associação com a histona H1 e passa a ter em torno de 180 kDa com as histonas H1. Ou seja, os complexos das enzimas topoisomerases do tipo II são cerca de duas vezes maiores que o tamanho de um nucleossomo típico da cromatina eucariótica (POMMIER et al., 2010).

No que diz respeito aos aspectos mecanísticos do funcionamento das topoisomerases, todas as enzimas caracterizadas até o momento estão implicadas, de alguma forma, em reações envolvendo a modulação do grau de superenrolamento do DNA. Apesar de existir uma grande sobreposição da ação geral entre as diferentes topoisomerases do DNA em uma mesma célula, cada uma das enzimas parece ser otimizada e adaptada evolutivamente para conduzir seu próprio repertório de alterações topológicas no DNA (figura 4). Um exemplo disso é que as Topo II bacterianas (conhecidas como DNA girases) são as únicas com a capacidade de promover a formação de moléculas superenroladas a partir de moléculas de DNA relaxadas. Por outro lado, o relaxamento de moléculas superenroladas de DNA é catalisado tanto por Topo I quanto por Topo II bacterianas e eucarióticas (figura 4 A). Outras funções atribuídas as Topo II consistem na concatenação e deconcatenação de moléculas circulares (figura 4 B) e na formação ou remoção de estruturas em forma de nó (*knots*) (figura 4 C) (BATES; MAXWELL, 1997).

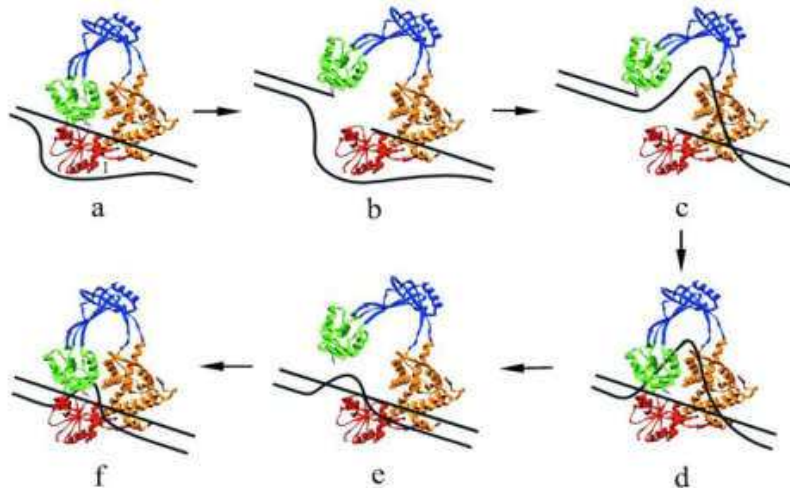


**Figura 4. Representação esquemática das reações catalisadas pelas enzimas topoisomerasas:** (a) superenrolamento/relaxamento catalisado pelas enzimas de classe I e II; (b) concatenação/decatenação, catalisada somente pelas enzimas de classe II e (c) formação/remoção de estruturas em forma de nó, também catalisada somente pelas enzimas de classe II. As transformações em (b) e (c) só podem ser realizadas pela passagem de um segmento de DNA de cadeia dupla através de outro. Fonte: Bates; Maxwell (1997).

### 1.2.3 DNA topoisomerases do tipo I

Nesta sessão faremos uma breve descrição das DNA topoisomerases do tipo I, porém, o maior detalhamento será relacionado a aspectos voltados para DNA topoisomeraese do tipo IIA, objeto de estudo desse trabalho.

A ação das topoisomerases do tipo I (figura 5) se inicia com o reconhecimento e clivagem do DNA alvo. Ocorre então a formação de uma ligação fosfotirosina covalente transitória com uma das extremidades da cadeia de DNA clivada, seja a extremidade 5' (para Topo IA) ou a 3' (para topo IB). No próximo passo ocorre à passagem da cadeia inteira através do espaço deixado pela quebra e finalmente a enzima promove a religação do segmento onde a clivagem foi produzida, alterando assim a topologia da molécula de DNA. As enzimas Topo I são capazes de alterar a topologia do DNA sem a necessidade de empregar uma fonte externa de energia metabólica. (Uma exceção a essa regra é a enzima DNA girase reversa (bacteriana), que é capaz de introduzir superenrolamentos positivos utilizando a energia derivada da hidrólise de ATP. De uma forma geral, o mecanismo de ação das enzimas Topo I envolve o armazenamento da energia da tensão torcional do DNA superenrolado e a utilização dessa mesma energia à medida que a reação prossegue (BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009).



**Figura 5. Mecanismo de ação geral proposto para as enzimas DNA topoisomerases I.** A ilustração demonstra a clivagem de uma única cadeia da hélice dupla de DNA (linhas pretas) e a passagem da segunda cadeia pela abertura gerada, promovida por mudanças conformacionais na estrutura da enzima: (a) mudança conformacional para o ataque nucleofílico da cadeia lateral da tirosina presente no sítio ativo em uma das fitas do DNA; (b) após a clivagem, o resíduo de tirosina permanece covalentemente ligado ao fosfato na porção 5' (DNA topoisomerases do tipo IA) ou 3' (DNA topoisomerases do tipo IB); (c) a abertura da enzima permite a passagem da cadeia íntegra pelo espaço gerado pela quebra; (d) após a passagem ocorre a religação da cadeia de DNA clivada; (e; f) a enzima muda novamente de conformação para liberar o DNA e completar o ciclo. Fonte: Champoux (2001).

Conforme visto anteriormente, as principais topoisomerases do tipo I são divididas entre subclasses IA e IB. Todas as enzimas do tipo IA utilizam o íon  $Mg^{2+}$  como cofator nas reações e são monoméricas, com exceção da DNA girase reversa da archaia *Methanopyrus kandleri*, que é um heterodímero (KRAH et al., 1996). Estas enzimas são encontradas em todos os domínios da vida e tem as funções concatenar, decatenar e relaxar estruturas superenroladas no DNA (FEINBERG, LIMA; MONDRAGÓN, 1999).

#### 1.2.4 DNA topoisomerases do tipo II

Os membros da classe II de DNA topoisomerases podem ser distinguidos com base na sua ação em processos de relaxamento, relacionados à decatenação ou concatenação do DNA. Assim essas propriedades refletem funções especializadas nas células. Durante sua ação, as DNA topoisomerases II clivam temporariamente ambas as fitas da hélice dupla de DNA, o que permite a passagem de um segmento de DNA externo através do espaço gerado pela quebra dupla, em uma reação dependente da hidrólise de ATP e da presença de íons de  $Mg^{2+}$ . Curiosamente, tanto a clivagem quanto a religação do DNA ocorrem sem aporte energético derivado da hidrólise do ATP (WANG, 1996;



CHAMPOUX, 2001). Em relação à homologia de suas sequências as DNA topoisomerasas II podem ser agrupadas e classificadas em subclasses IIA e IIB, compartilhando pouca similaridade entre os aminoácidos nas sequências das duas subunidades da proteína (BERGERAT et al., 1997; WANG, 2002). Resumidamente, as topoisomerasas da subfamília do tipo IIB, é a Topoisomerase VI de *Sulfolobus shibatae* (reino Archea). Dentre as suas ações estão a capacidade de relaxar o DNA DNA superenovelado positivamente e negativamente, concatenar e decatenar moléculas de DNA circulares na presença de ATP e cátions divalentes (BERGERAT et al., 1997).

### 1.2.5 DNA topoisomerasas do tipo IIA

As enzimas DNA topoisomerasas IIA são consideradas essenciais à sobrevivência dos organismos e suas funções vitais não podem ser totalmente complementadas pela expressão de outras topoisomerasas, mesmo considerando que ambas as classes enzimáticas (tipo I e II) podem remover superenrolamentos do DNA. Por exemplo, foi descrito que cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em Topo II morrem durante a mitose, demonstrando a importância fundamental da ação de Top II para a condensação e segregação dos cromossomos (GOTO; WANG, 1985). A incapacidade das leveduras deficientes em Top II passarem pela fase M do ciclo celular é justificada pelo fato de que somente as Top II são capazes de realizar a separação de longas moléculas de DNA entrelaçadas (como ocorre com os cromossomos eucarióticos), assim como de círculos de DNA interconectados (ou catenanos, como ocorre com os cromossomos procarióticos e genomas mitocondriais). Essa separação é obrigatória ao final da replicação do genoma, pois garante a segregação dos cromossomos recém replicados no momento da divisão celular (GOTO; WANG, 1985).

Os vertebrados possuem duas isoformas de DNA topoisomerasas do tipo II, enquanto em leveduras e invertebrados apenas um gene foi identificado para esta enzima. As isoformas presentes em mamíferos são classificadas como Top II $\alpha$  e Top II $\beta$ . Enquanto a expressão de Topo II $\alpha$  é mais restrita nas células em proliferação, com níveis cerca de 2 a 3 vezes maiores em células com alta capacidade proliferativa do que em células quiescentes e esse aumento é particularmente notável durante a transição G2/M. Já a isoforma Topo II  $\beta$  é mais expressa em células quiescentes (AUSTIN et al., 2018). Foi visto também que ambas as isoformas relaxam de forma mais eficiente o DNA

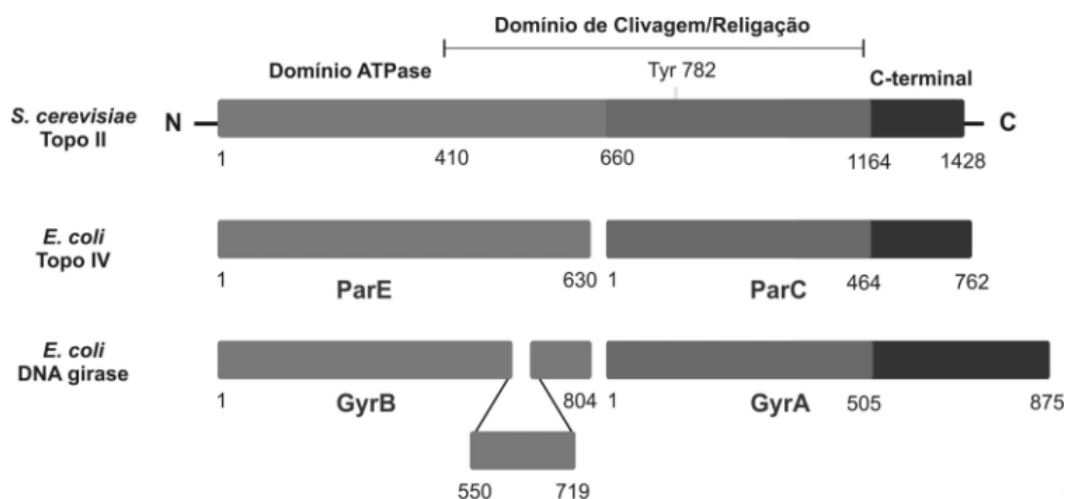
superenrolado positivamente do que o superenrolado negativamente (MCCLENDON; RODRIGUEZ; OSHEROFF, 2005). Estudos com roedores demonstraram também que, na ausência da enzima Topo II $\beta$ , camundongos mutantes não exibem fenótipos anormais ao longo do desenvolvimento embrionário, todavia morrem ao nascer devido a danos neurológicos, possivelmente causados pelo papel crítico da Topo II $\beta$  na transcrição gênica nos tecidos neurais (LYU; WANG, 2003)

Quanto à estrutura, as DNA topoisomerasas II são sempre compostas por mais de uma subunidade. As enzimas eucarióticas e de poxvírus (vírus vaccínia) são homodiméricas, enquanto as bacterianas (DNA girase, topoisomerase IV e topoisomerase VI) são tetrâmeros formados pela junção de duas subunidades diferentes. Já a topoisomerase II do bacteriófago T4, por sua vez, possui três subunidades distintas (WANG, 1996). A DNA girase, dentre todas as DNA topoisomerasas II, é a única capaz de utilizar a energia da hidrólise do ATP para introduzir superenrolamento negativo no DNA (GELLERT et al., 1976).

As DNA topoisomerasas do tipo IIA compartilham uma identidade de sequência significativa ao longo de suas estruturas primárias e possuem uma história evolutiva particular em que o gene que codifica a enzima eucariótica (nuclear) surgiu de uma fusão entre os genes que codificam as duas subunidades diferentes das topo IIA procarióticas (figura 6). Como os genes de todas as topoisomerasas IIA eucarióticas descritas possuem essa estrutura fusionada, é presumível que a fusão tenha ocorrido no último ancestral comum dos organismos eucarióticos (CHAMPOUX, 2001).

As bactérias geralmente expressam duas topoisomerasas do tipo IIA, a topoisomerase IV e a DNA girase, que são altamente conservadas com relação às topo IIA eucarióticas. As enzimas bacterianas funcionalmente ativas estão envolvidas no relaxamento, segregação cromossômica e no superenrolamento do DNA (CORBETT; BERGER, 2003). A Topo IV é organizada como um tetrâmero composto por duas cópias de duas subunidades (ParE e ParC), que juntas formam o complexo ativo. A DNA girase também se organiza de forma semelhante, formando um tetrâmero com duas cópias de cada uma das subunidades GyrA e GyB (NICHOLS et al., 1999).

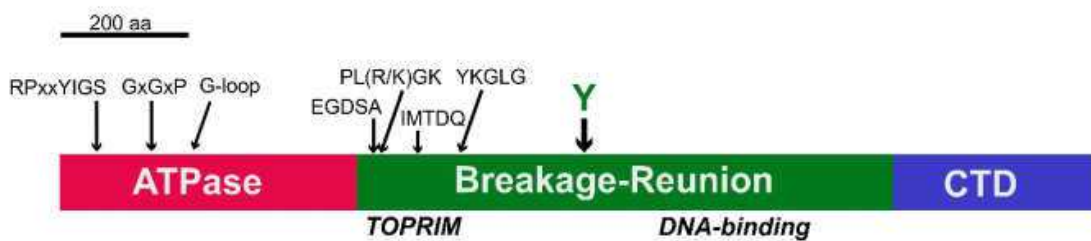
Com relação à estrutura de domínios proteicos, as topoisomerases IIA eucarióticas apresentam um domínio com atividade de ATPase na região amino-terminal, um domínio catalítico central de quebra e religação do DNA (“tower” e C-gate) e um domínio carboxi-terminal. Em bactérias, o domínio com atividade de ATPase e uma região de ligação ao  $Mg^{2+}$ , denominada TORPIM estão contidos nas subunidades ParE e GyrB, enquanto o domínio catalítico central e o domínio carboxi-terminal é representado pelas ParC e GyrA bacterianas (figura 6). Esses domínios são conservados em todas as DNA topoisomerases do tipo II descritas, incluindo enzimas bacterianas, fúngicas e as humanas (figura 7) (AUSTIN et al., 1993).



**Figura 6.** Esquema representativo de comparação entre os domínios funcionais das DNA topoisomerases IIA de *E. coli* e *S. cerevisiae*. Região amino-terminal: domínio ATPase e TORPIM (subunidades ParE e GyrB). Região carboxi-terminal (subunidades ParE e GyrB). Fonte: Adaptado de Champoux (2001).

Todas as DNA topoisomerases do tipo IIA compartilham alta similaridade entre as suas sequências de aminoácidos e variam significativamente apenas em uma região com cerca 170 resíduos de aminoácidos situada na região N-terminal GyrB e em outra, correspondente ao domínio carboxi-terminal (SHAIU; HU; HSIEH, 1999). Nos vertebrados, as Topo II $\beta$  compartilham cerca de 68% dos aminoácidos com as DNA Topo II $\alpha$ , porém essa identidade não é distribuída uniformemente ao longo da estrutura primária. Neste contexto podemos dizer que uma parte da enzima é altamente conservada (domínios N-terminal e centrais), compartilhando 78% de identidade, enquanto o domínio C-terminal compartilha apenas 37% dos resíduos de aminoácidos, sendo essa região bem menos conservada (figura 7). A sequência divergente do domínio C-terminal sugere o

desempenho de atividades diferenciadas entre as duas isoformas, tanto *in vitro* com *in vivo* (AUSTIN et al., 1995). Foi também verificado que o domínio C-terminal só vai apresentar similaridades de sequência em espécies relacionadas, caracterizando esse domínio como espécie específica. As sequências geralmente contidas nesta região das DNA Top IIA são responsáveis por diferentes papéis na célula, como o endereçamento celular, visto que essas proteínas podem ser nucleares ou mitocondriais. Esse domínio parece também estar envolvido na interação com outras proteínas (SHAIU; HU; HSIEH, 1999). Curiosamente, nas girases bacterianas a região capaz de envolver o segmento do DNA e introduzir um superenrolamento negativo está localizada no domínio C-terminal da GyrA (SENGUPTA et al., 2005).

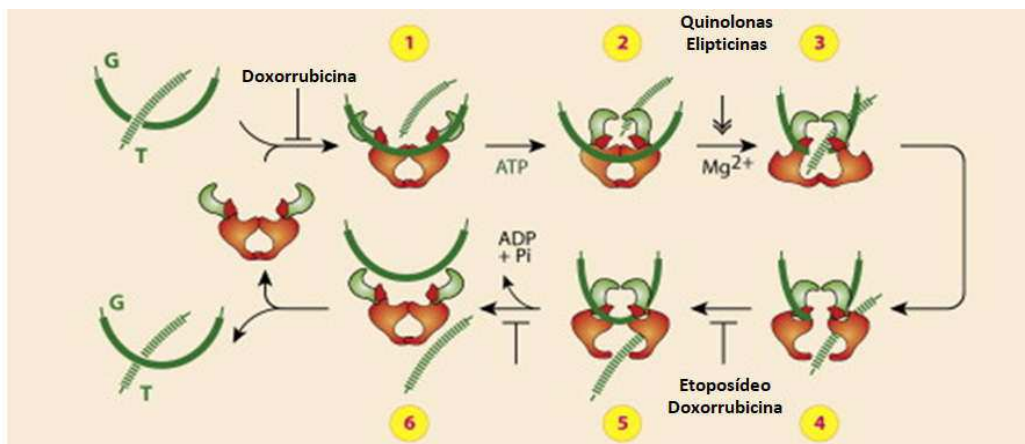


**Figura 7. Representação esquemática da organização dos domínios funcionais da topoisomerase II $\beta$  humana.** O domínio ATPase é demonstrado em vermelho, o domínio de religação do DNA em verde e o domínio C-terminal em azul (CTD). TOPRIM: Domínio topoisomerase-primase. As setas indicam as posições aproximadas dos motivos funcionais conservados. Fonte: West e colaboradores (2000).

### 1.2.6 Ciclo catalítico das DNA topoisomerases do tipo IIA

A atividade ATPásica das topoisomerases do tipo II reside no seu domínio N-terminal e foi confirmada em espécies distantes, como bactérias, tripanossomatídeos e também para a DNA topoisomerase II $\alpha$  humana (SENGUPTA et al., 2005). Os passos que compõe a ação completa das DNA Top II envolvem um ciclo catalítico que se inicia com a ligação do ATP ao domínio ATPase. A presença do ATP leva à dimerização deste domínio e ao fechamento da porção amino-terminal da proteína. Inicialmente o movimento produzido nesta região conduz a uma série de mudanças conformacionais que, em seguida, promovem a passagem e liberação da molécula de DNA (figura 8) (BERGER et al., 1998).

Assim como as topoisomerases do tipo I, as do tipo II possuem uma seletividade por uma sequência relativamente relaxada, o que permite sua ação em múltiplos locais no genoma. No entanto, o dímero enzimático se liga preferencialmente a regiões de cruzamento do DNA (DNA superenrolado, formando nós ou catenanos). Berger e colaboradores (1998), com base em dados de microscopia eletrônica e cristalografia de raio X, propuseram as linhas gerais para o mecanismo de ação da topoisomerase II de levedura e da DNA girase bacteriana observado na figura 8. Neste modelo os dois segmentos do DNA que participam da reação são definidos como segmentos “G” e “T” de forma a facilitar o entendimento dos eventos da reação. Assim, G é o segmento “*gate*” (portal) que será clivado pela enzima para possibilitar a passagem do segmento T (transportado) através do complexo enzima-DNA clivado, sendo que o segmento T pode ou não fazer parte da molécula clivada (no caso de fazer parte, é um segmento que se encontra distante do local de clivagem). De forma sucinta, os passos reacionais do ciclo catalítico terão início com a ligação do ATP, promovendo uma mudança conformacional na enzima, de uma forma aberta para uma braçadeira fechada (figura 8, etapas 1 e 2). Na presença de  $Mg^{2+}$ , os resíduos de tirosina presentes nos sítios catalíticos de cada monômero da enzima atacam e rompem duas ligações fosfodiéster separadas por quatro pares de bases de distância e em filamentos opostos do segmento G de DNA, tornando a enzima covalentemente ligada às extremidades 5' da fita de DNA clivada. Assim o segmento T pode então ser passado pelo espaço aberto deixado pela clivagem do segmento G (figura 8, etapas 3 e 4). Após a passagem do segmento T, o mesmo é liberado e as extremidades clivadas do segmento G são religadas dentro do complexo da topoisomerase II (figura 8, etapas 5 e 6). Em seguida ocorre a hidrólise do ATP, que converte o complexo à sua forma inicial de braçadeira aberta e permite que ocorra a liberação do segmento G (figura 8, etapa 6). Assim podemos dizer que o fechamento e a abertura da braçadeira na enzima são acoplados à hidrólise de ATP.



**Figura 8. Representação esquemática do mecanismo de ação proposto para as DNA topoisomerases tipo IIA.** (1 e 2) A enzima se liga a um DNA dupla fita (segmento G) na região que contém o domínio de clivagem e religação; (3) Uma segunda molécula de DNA dupla fita (segmento T) se liga a enzima e a ligação de um ATP e promove a dimerização dos domínios ATPase, que conseqüentemente levam a clivagem do segmento G e o transporte do segmento T pelo espaço gerado; (4) O segmento T fica retido no espaço oposto correspondente a porção C-terminal do domínio de clivagem; (5) O segmento G é religado e o segmento T é liberado a partir da mudança conformacional da enzima. Fonte: Adaptado de Pommier e colaboradores (2010).

### 1.2.7 Ação biológica das DNA topoisomerases na célula

As atribuições funcionais das DNA topoisomerases só podem ser provisoriamente definidas dependendo do estado topológico que os cromossomos vão se encontrar em diferentes organismos, isto é, nos processos celulares que envolvem o metabolismo do DNA na célula. Embora geneticamente seja demonstrado uma sobreposição de função entre as topoisomerases do tipo II, cada isoforma parece otimizada para desempenhar seu próprio conjunto de manipulações topológicas, principalmente, na replicação, transcrição e recombinação do DNA (VOS et al., 2011)

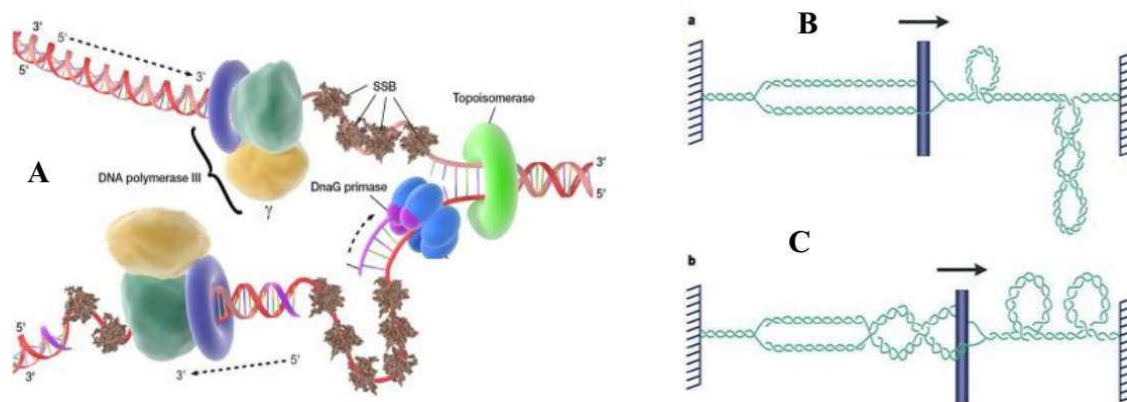
### 1.2.8 Função das topoisomerases II na replicação

Dentro os eventos que dependem da ação das topoisomerases, a replicação (figura 9 A) é o mais conhecido, por gerar o superenrolamento do DNA durante o deslocamento das forquilhas de replicação. Se considerarmos que uma vez que a maquinaria de replicação fosse impedida de girar ao redor do DNA ao longo da replicação semiconservativa, superenrolamentos positivos são gerados à frente da forquilha de replicação e atrás a forquilha tende-se a se tornar cada vez maiores (figura 9 B) (COOK, 1999). Neste cenário, as topoisomerases do tipo II e do tipo IB são cruciais para promover

o relaxamento dessas estruturas, atuando no relaxamento dos superenrolamentos positivos a frente da maquinaria da replicação (WANG, 1996).

Uma vez que a maquinaria de replicação pode girar ao redor do eixo do DNA, os superenrolamentos positivos formados a frente da forquilha podem ser reorganizados atrás desta região, ocasionando o entrelaçamento do par de fitas duplicadas ou a formação de novos superenrolamentos positivos nesta região (figura 9C) (WANG, 2002). Postow e colaboradores (2001) descreveram que, no modelo de replicação citado anteriormente, as topoisomerases do tipo II podem atuar atrás da forquilha de replicação, realizando a remoção do entrelaçamento das duplas fitas recém sintetizadas. As topoisomerases do tipo II e do tipo IB participam de forma ativa na elongação da replicação, enquanto que as do tipo IA são menos necessárias, pela atuação mais restrita, pois agem apenas na remoção de superenrolamentos positivos onde houver uma região de fita simples clivada (WANG, 1996).

Nos procariotos, como *E. coli*, o superenrolamento negativo nos cromossomos, pela ação da DNA girase em combinação com atividade das proteínas *E. coli* Muk são essenciais para condensação cromossômica e divisão celular de forma adequada (HOLMES; COZZARELLI, 2000). Numa outra descrição, também foi observado que além do seu papel de decatenação na replicação, a DNA topo IV, também promove o relaxamento de superenrolamentos negativos na célula (ZECHIEDRICH et al., 2000). Implicando assim, as topoisomerases IV e I em atividades que promovem o superenrolamento excessivo da DNA girase (TSE-DINH, 1998). Então a participação das topoisomerases I, IV e Girase, juntas, definem o nível do estado estacionário de superenrolamentos negativos que são necessários para o início da replicação e da transcrição em pelo menos alguns dos promotores (ZECHIEDRICH et al., 2000).



**Figura 9. Atuação das DNA topoisomerases na replicação.** (A) Esquema geral da forquilha de replicação incluindo a maquinaria de replicação envolvida no processo. (B/C) Problemas topológicos associados com a elongação da forquilha de replicação. SSB: proteína ligadora de fitas simples. A barra em azul representa a maquinaria de replicação em movimento. Fonte: Champoux (2001).

Estudos em diferentes organismos suportam os eventos da replicação descritos anteriormente. Por exemplo, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a etapa de elongação da replicação tem participação tanto da topoisomerase IB quanto do tipo IIA (KIM; WANG, 1989). Também foi descrito que o papel da Top IB é dispensável para o crescimento celular em *S. cerevisiae* e *S. pombe*, enquanto a ação da topoisomerase IIA é fundamental para decatenar os cromossomos e prepará-los para mitose (HOLM et al., 1985). Ambas as isoformas humanas (Top II $\alpha$  e Top II $\beta$ ) são essenciais na mitose de leveduras, uma vez que a Top II $\alpha$  demonstrou-se capaz de recuperar o potencial de proliferação em cepas de levedura que carregam uma mutação sensível a temperatura no gene que codifica a isoforma Top II $\beta$  (MECZES et al., 1997). No entanto em células embrionárias de camundongos somente a isoforma  $\alpha$  é capaz de exercer funções essenciais aos eventos mitóticos, sua depleção causa divisão nuclear incompleta seguida por citocinese forçada (AKIMITSU et al., 2003). Em outro estudo, camundongos completaram o desenvolvimento intrauterino na ausência do gene *top2b*, mas morreram logo após o nascimento por falta de inervação no diafragma. Os axônios motores desses animais apresentaram falhas no contato com o músculo esquelético, enquanto os axônios sensoriais possuíam defeitos ao entrar na medula espinhal. Tais efeitos sugerem um papel maior dessa isoforma em eventos transcricionais (YANG et al., 2000). E podem ser implicados na participação de Top II $\beta$  no reparo do DNA (POPANDA, THIELMANN 1992). Acredita-se que esta isoforma tenha envolvimento na expressão gênica, especialmente



em células não proliferantes como os neurônios. Tendo em vista que estudos já demonstraram que a DNA topoisomerase do tipo II eucariótica pode formar complexos com proteínas envolvidas na expressão gênica (KOBAYASHI, ADACHI, KOYAMA, 1998) e remodelação da cromatina (VARGA-WEISZ et al., 1997)

Estudos no peixe zebra *Danio rerio* demonstraram que a Top II $\alpha$  codificada maternamente permite o desenvolvimento inicial antes da transição “*mid-zygotic*” e também que seus níveis transcricionais são mantidos após este ponto. Nesses estágios, foi ainda observado que o papel funcional do gene da Top II $\alpha$  não pode ser substituído ou compensado pelo gene da Top II $\beta$  (SAPETTO-REBOW et al., 2011). Também em *D. rerio* um estudo mostrou um mutante para o gene *top II $\beta$*  apresenta danos na segmentação de neuritos para camada plexiforme interna, o que acarreta alterações na orientação dos axônios para a retina (NEVIN et al., 2011), implicando assim o papel do gene *top II $\beta$*  durante o desenvolvimento neural. Em *D. melanogaster*, um organismo com apenas uma isoforma da enzima, as atividades exercidas pela das DNA topoisomerase II são essenciais a todas as células, independente da especialização. Nesses insetos, foi verificado que ao longo do ciclo celular a DNA topoisomerase II é responsável pela separação das moléculas de DNA recém duplicados concatenados, contribuindo também para o relaxamento do DNA durante a transcrição e outros processos celulares (OSHEROF; SHELTON; BRUTLAG, 1983).

### **1.2.9 Função da DNA topoisomerase II na transcrição**

Da mesma forma que na replicação, a transcrição promove alterações na topologia do DNA. Uma vez que uma RNA polimerase em movimento produz superenrolamento positivo a frente e superenrolamento negativo atrás da bolha de transcrição. É importante mencionar que essas alterações causadas pela superenrolamento do DNA podem levar a mudanças significativas na expressão gênica. Outra situação, é que o DNA superenrolado tem maior propensão de formar híbridos de RNA-DNA estáveis (*loops-R*) do que os duplex relaxados (VOS et al., 2011). A formação dessas estruturas pode inibir o crescimento das células e também levar a instabilidade genômica por prorrogar os garfos de replicação e promover quebras do DNA em genes que podem ser altamente transcritos (TUDURI et al., 2009).

As topoisomerasas dos tipos IA e IB têm sido implicadas na remoção de superenrolamentos negativos, suprimindo a formação de *loops*-R (TUDURI et al., 2009). A porção C-terminal das topo IA de *E. coli* interage diretamente com a RNA polimerase, essa interação pode ajudar a recrutar a topo IA para o superenrolamento negativo. As topoisomerasas IB favorecem o relaxamento do superenrolamento positivo a frente do local de transcrição das polimerases. Assim como as topo IB desempenham um papel crucial na transcrição eucariótica, as topo IV e DNA girases realizam essa função nas bactérias (ZECHIEDRICH et al., 2000). É difícil estabelecer uma ligação direta entre a atividade das DNA topoisomerasas e o processo de transcrição *in vivo*, devido às múltiplas funções da enzima e da complexidade experimental, geralmente os estudos *in vitro* conseguem fazer melhor está relação. Onde já foi observado que a transcrição de diversos genes pela RNA polimerase II é sensível a inibição da DNA topoisomerase II em cultura de linfócitos B (COLLINS; WEBER; LEVENS, 2001).

Em outra perspectiva, as topoisomerasas são associadas a processos específicos inerentes a transcrição, como a ativação ou repressão de promotores específicos ou no remodelamento da cromatina. Em *S. cerevisiae*, por exemplo, a inativação de topo IB promove a acetilação e metilação específica em histonas, que levam ao aumento da transcrição gênica em regiões próximas dos telômeros (LOTITO et al., 2008). Durand-Dubief e colaboradores (2010) em experimentos realizados com *S. pombe* apresentaram evidências de que a top IB exerce influência na montagem dos nucleossomos em determinadas regiões promotoras. Por fim, essas descrições sugerem que a DNA topoisomerase II, em associação com outros fatores, promove alterações na topologia do DNA e garante assim que a transcrição ocorra de forma adequada.

### **1.2.10 Inibidores de DNA topoisomerasas do tipo II**

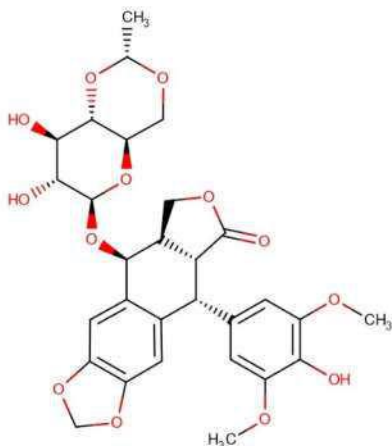
Devido aos importantes papéis desempenhados pelas topoisomerasas do DNA, tais enzimas são constantemente empregadas como alvos moleculares para o desenvolvimento de inibidores farmacológicos sejam para estratégias terapêuticas em diversos tipos de câncer ou como alvos para agentes bactericidas e antiparasitários (CHEESMAN, 2000; D'ATANASIO et al., 2020; KOLARIC; ANDERLUH; MINOVSKI, 2020). Além da importância em funções vitais básicas, a escolha dessas enzimas como alvos moleculares deve-se também ao fato de que a expressão gênica das DNA

topoisomerasas costuma ser mais elevada em tumores ou tipos celulares com alta taxa proliferativa (CHEESMAN et al., 1994).

Os inibidores de topoisomerasas do tipo IIA são por vezes descritos como “venenos de topoisomerasas” e de acordo com seus mecanismos de ação podem ser divididos em duas classes, sendo os de primeira classe aqueles que atuam através da estabilização do complexo covalente (complexo enzima-DNA, comumente descrito como Top2cc – Top2 *closed complex*) e os de segunda classe aqueles que agem inibindo diretamente a formação de complexos covalentes (TOPCU, 2001). Com relação ao primeiro grupo de inibidores, que estabilizam o Top2cc, a interação covalente estabilizada é a que envolve uma extremidade 5' PO<sup>4-</sup> do DNA e o principal resíduo de tirosina do sítio ativo da enzima. O complexo Top2cc estabilizado pelo inibidor promove quebras na estrutura do DNA ligado à enzima, principal causa para a ocorrência de danos persistentes no DNA e da citotoxicidade desses inibidores (NITISS; BECK, 1996; BANDELE; OSHEROFF, 2008; DE CAMPOS NEBEL, PALMITELLI, GONZÁLEZ-CID et al., 2017).

Podemos classificar os principais inibidores de DNA topoisomerase II com atividade antitumoral com base na sua interação com essa enzima. Dessa forma os inibidores etoposídeo (VP-16) (figura 8, inibição dos passos 4 e 5; figura 10), teniposídeo (VM-26), ansacrina (m-AMSA) e asantraciclina atuam inibindo a religação do complexo Top2cc, enquanto os inibidores dos grupos das elipticinas, das isoflavonas, das azatoxinas e das quinolonas promovem a estabilização e formação dos complexos Top2cc (figura 8, inibição dos passos 2 e 4) (FORTUNE; OSHEROFF, 2000). De forma que os diferentes inibidores atuam cessando o ciclo catalítico enzimático, impedindo assim o curso da reação. Até mesmo a cinética de religação e formação dos Top2cc na presença dos inibidores podem variar de lenta, como no caso da doxorubicina (uma antraciclina, figura 8, inibição dos passos 1 e 4), a muito rápida, como nos casos do etoposídeo, da ansacrina e da elipticina (LONG; MUSIAL; BRATTAIN, 1985; ZWELLING et al., 1981). Outro ponto importante a ser mencionado é que ao inibir as DNA topoisomerasas IIA, as moléculas em questão podem não só produzir quebras de fita dupla do DNA (DSBs - *Double-Strand-Breaks*), mas também quebras de fita simples (SSBs - *Single-Strand-Breaks*). Alguns estudos realizados no final da década de 80 observaram que as

elipticinas produzem quase sempre DSBs, enquanto que para outros inibidores foi observado um padrão diferente, no qual o etoposídeo e a ansacrina produzem entre 7 e 20 SSBs por DSB, enquanto as antraciclinas tendem a produzir uma proporção semelhante de SSBs e DSBs. Essas características são consideradas essenciais para determinação da citotoxicidade desses inibidores (LONG; MUSIAL; BRATTAIN, 1985; POMMIER et al., 1984; ZWELLING et al., 1981).



**Figura 10. Estrutura química do etoposídeo (VP-16-213):** Inibidor semi-sintético de DNA topoisomerasas II empregado na quimioterapia de vários tumores. Fonte: *Drugbank* (código: DB00773; <https://www.drugbank.ca/>).

Os antibióticos que atuam como inibidores de topoisomerasas IIA afetam as células bacterianas de diversas formas, agindo de forma efetiva sobre o grau de superenrolamento do DNA e promovendo um impacto considerável sobre a expressão gênica. Em geral, com respeito à DNA girase, esses inibidores demonstram especificidade para a subunidade GyrA ou para a GyrB (CHAMPOUX, 2001). Podemos apontar a subunidade GyrA como alvo das quinolonas (ofloxacina, norfloxacina, perfloxacina e ciprofloxacina), enquanto que a subunidade GyrB é fortemente inibida pelas coumarinas, tendo a novobiocina como agente com efeito mais pronunciado entre as demais. Além disso, os mecanismos de ação apresentados por estes antibióticos também diferem com relação ao sítio de interação na enzima. Enquanto as quinolonas bloqueiam a clivagem e a religação das cadeias do DNA, a novobiocina, apesar de não apresentar semelhança estrutural ao ATP, compete com este pelo sítio de ligação na proteína. Dessa forma, ao bloquear o acesso ao ATP, a novobiocina atua reduzindo a afinidade da enzima pelo seu cofator na reação (COZZARELLI, 1980).

As topoisomerases IIA vêm sendo também consideradas como um importante alvo para o planejamento de fármacos antiparasitários desde a década de 1990 (BURRI; BODLEY; SHAPIRO, 1996; CHEESMAN, 2000). Uma das primeiras classes de compostos que demonstraram potencial antiparasitário contra *Plasmodium falciparum* foram os derivados da 9-anilinoacridina, substância conhecida por apresentar atividade antitumoral pela inibição da topoisomerase IIA (CHAVALITSHEWINKOON et al., 1993). Desde então, tendo como base a ansacrina (m-AMSA), muitos análogos desse inibidor foram sintetizados e avaliados como potenciais agentes antiparasitários, tanto *in vitro* quanto em ensaios clínicos avançados (FU; XIAO, 1991). A pironaridina (uma 9-anilino-aza-acridina), por exemplo, inibe a atividade de decatenação da topoisomerase IIA em *P. falciparum* (AUPARAKKITANON; WILAIRAT, 2000).

As epipodofilotoxinas formam um grupo de inibidores de topoisomerases II, que inclui os já mencionados etoposídeo (VP16) e teniposídeo (VM26), que são empregados clinicamente na terapia de diversos tipos de tumores. Além de serem potentes medicamentos antitumorais, existem também evidências de que as propriedades inibitórias dessas substâncias podem vir a ser aplicadas também a parasitos (KELLY; MCROBERT; BAKER, 2006; MESLIN et al., 2007). Por exemplo, um estudo realizado ainda da década de 90 demonstrou a eficácia do etoposídeo em ensaios com *P. falciparum*, onde o tratamento do parasito durante sua fase sanguínea resultou em lesões do DNA nuclear e também no DNA do apicoplasto, com indução da perda da viabilidade e morte celular (WEISSIG; VETRO-WIDENHOUSE; ROWE, 1997). Estudos posteriores evidenciaram também que o tratamento de *P. falciparum* com etoposídeo induz um processo de morte celular muito semelhante à apoptose (MESLIN et al., 2007).

Embora os mecanismos que regem os efeitos citotóxicos causados pelos inibidores das DNA topoisomerases não estejam totalmente esclarecidos, os danos diretos no metabolismo de DNA são claramente os principais fatores associados à morte celular. De uma forma geral, a formação dos complexos inibidor-DNA-enzima bloqueia os movimentos das forquilhas de replicação e transcrição e a separação dos cromátides-irmãs após a replicação. Além disso, os inibidores promovem um acúmulo de DBSs e SSBs que podem levar a parada do ciclo celular e morte celular programada.

Contudo as topoisomerases do DNA são bons alvos moleculares, uma vez que suas atividades estão envolvidas no desenvolvimento (metamorfose) e manutenção celular de diferentes organismos, implicando seu papel nos processos que requerem intensa divisão celular. Nesse sentido o presente trabalho fez uma caracterização estrutural e funcional da DNA topoisomerase II do mosquito *Ae. aegypti*, identificando possíveis pontos seletivos na interação da proteína do inseto com o inibidor clássico etoposídeo *in silico*, assim como uma análise funcional detalhada dos efeitos do inibidor na fase larval e nas células de *Ae. aegypti* através de diferentes metodologias.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar a estrutura e as funções da DNA topoisomerase II no vetor *Aedes aegypti*, investigando seus papéis na proliferação e morte celular, bem como sua importância para biologia do mosquito.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificação e análise filogenética da sequência completa do gene da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*;
- Caracterizar a estrutura da DNA Topoisomerase II de *Ae. aegypti*, através de modelagem comparativa e do *docking* molecular entre o modelo da enzima e o inibidor etoposídeo (VP-16-213);
- Determinar, através de RT-qPCR, o perfil de expressão gênica da DNA topoisomerase II nos estágios de desenvolvimento e nos órgãos do mosquito adulto *Ae. aegypti*;
- Investigar a expressão espacial do mRNA da enzima DNA topoisomerase II no ovário de fêmeas de *Ae. aegypti* através de hibridização *in situ*;
- Verificar a atividade larvicida e formação de pupas, através do bioensaio com larvas expostas ao inibidor etoposídeo;
- Analisar a sobrevivência, proliferação e morfologia das células Aag2 de *Ae. aegypti* tratadas com etoposídeo;
- Avaliar o perfil de morte celular das células Aag2 tratadas com etoposídeo através da marcação com anexina-V e iodeto de propídeo e análise da fragmentação do DNA internucleossomal.
- Investigar os efeitos do etoposídeo no ciclo celular de das células Aag2 através citometria de fluxo.
- Determinar *in vitro* o efeito do etoposídeo na atividade de decatenação do extrato nuclear das células do mosquito *Ae. aegypti*.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Manutenção da colônia de mosquitos *Aedes aegypti*

Os protocolos experimentais e animais utilizados para alimentação dos mosquitos recebeu aprovação e concordância da Comissão de Ética e Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro/Campus Macaé, sob o número de referência MAC002.

Os mosquitos *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram mantidos no insetário do Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda- LIBHM, na UFRJ/Campus Macaé, em um ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, com umidade relativa de 60-70% a 28 °C. Os adultos eram mantidos confinados em potes plásticos medindo 25 × 20 cm de diâmetro, alimentado com solução de sacarose 10% *ad libitum*. As fêmeas adultas realizavam o repasto sanguíneo a cada 7 dias em camundongos da linhagem Swiss. As larvas dos diferentes estágios do mosquito eram mantidas em bandejas medindo 45 × 25 cm de diâmetro com água destilada, acrescida de aproximadamente 500 mg de ração de roedores triturada, totalizando aproximadamente 100 larvas por bandeja nesta manutenção.

#### 3.2 Bioensaio de atividade larvicida com inibidor etoposídeo

##### 3.2.1 Curva de sobrevivência/mortalidade

O bioensaio foi realizado em placa de 6 poços, com 20 larvas de segundo estágio por poço, em um volume final de 6,5 mL por ensaio. O bioensaio foi realizado nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM de etoposídeo (VP-16-213; *Sigma-Aldrich*) em triplicata, totalizando 60 larvas para cada teste na observação. Foram feitos dois controles, sendo um com 0,2% do veículo (dimetilsulfóxido - DMSO) em água destilada e outro com apenas água destilada, ambos acrescidos de ração de roedor. A sobrevivência das larvas foi avaliada em intervalos de aproximadamente 24 horas (a cada dia) com auxílio de microscópio estereoscópico (lupa). As larvas sem movimento foram consideradas mortas, contabilizadas e retiradas do teste. A observação do ensaio teve duração de 10 dias, onde também foi avaliada a taxa de formação de pupas até o fim do

experimento (10<sup>o</sup> dia). A formação de pupas por concentração do inibidor foi normalizada em porcentagem, tendo como referência o valor de 100% para o controle com DMSO. Os dados de sobrevivência/mortalidade foram plotados em um gráfico do tipo Kaplan-Meier e as curvas foram comparadas empregando os testes de Mantel-Cox (com  $p < 0,0001$ ) para verificação de diferença significativa entre elas e o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon (com  $p < 0,0001$ ) para verificação de tendência ou efeito de dose. A análise foi feita com o programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 6 (versão 6.01; *GraphPad Software, Inc.*).

### **3.2.2 Análise morfológica das larvas expostas ao etoposídeo**

Para avaliação dos efeitos morfológicos ao longo do tratamento foi realizado um bioensaio utilizando um número de 5 larvas de 2<sup>o</sup> estágio por poço, em placa de 12 poços, com volume final de 2,5 mL por teste (este protocolo foi estabelecido para otimizar a quantidade do inibidor utilizada no ensaio). Com o intuito de analisar as alterações morfológicas promovidas pela inibição da enzima DNA topoisomerase II, as larvas foram expostas às concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de etoposídeo (VP-16-213), sendo comparadas com um controle contendo 0,2% do veículo (DMSO). Os registros das alterações morfológicas nas larvas foram feitos a partir do 8<sup>o</sup> e até ao 15<sup>o</sup> dia de observação, em microscópio estereoscópico, modelo M205FA (*Leica*).

Durante os bioensaios, as soluções de tratamento com inibidor foram repostas com aproximadamente 5 dias, assim como a adição de ração triturada quando necessário, garantindo assim a fonte de alimento das larvas e a viabilidade e disponibilidade do inibidor ao longo do ensaio. A placa do ensaio foi mantida sem a tampa e inserida em uma câmara úmida para minimizar a evaporação dos meios durante todo período do bioensaio.

O experimento foi realizado em triplicata, duas vezes de forma independente, e as imagens selecionadas representam qualitativamente o perfil dos efeitos morfológicos nas larvas tratadas em relação ao controle.

### 3.3 Análise de expressão relativa por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

#### 3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para RT-qPCR

As sequências de *Ae. aegypti* para o gene da enzima DNA topoisomerase II e para gene da proteína ribossomal S7-RPS7 (gene de referência/controlado endógeno) foram obtidas por meio de busca em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e <https://www.vectorbase.org/>). Os oligonucleotídeos iniciadores para uso em RT-qPCR foram elaborados utilizando o software *Primer3* (<http://primer3.wi.mit.edu/>, v. 4.1.0). Os pares de oligonucleotídeos foram desenhados de forma a estarem posicionados em exons diferentes, possuírem uma temperatura de anelamento ( $T_m$ ) de aproximadamente 62 °C, um conteúdo de GC de aproximadamente 50% e possuírem produtos previstos para cada técnica a ser realizada (descrição do pb quadro 2). Posteriormente, as sequências obtidas foram analisadas na ferramenta *Oligo Analyzer Tool* (<http://idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>, *Integrated DNA Technologies - IDT*), para garantir a ausência de formação de estruturas em grampo, de homodímeros e heterodímeros. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores confeccionados estão representadas no quadro 2.

**Quadro 2.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Gene alvo e uso	Oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')	Amplicon (pb)
<b>DNA topoisomerase II: RT-qPCR</b>	Senso- ATTGGATCTCAGGTCAAGGTG Antissenso- GGTAATGTAGTCTACGTGGCG	147
<b>S7: RT-qPCR</b>	Senso- ACCGCCGTCTACGATGCCA Antissenso-ATGGTGGTCTGCTGGTTCTT	130
<b>DNA topoisomerase II: Hibridização <i>in situ</i></b>	Senso- gcccgcgCAGCTTTTCGCTGCGCAGAAT Antissenso- cccggggcAGATGTTACACAACCTGGCACCG	500
<b>Oskar: Hibridização <i>in situ</i> (controle positivo)</b>	Senso- gcccgcgCTGGTCCTCGGGACAAGTTC Antissenso- cccggggcAGCGGTAAAAGGGTGGTTAG	520
<b>Adaptadores universais para promotor de T7</b>	Senso- GAGAATTCTAATACGACTCACTATAgcccgcg Antissenso- GGGATCCTAATACGACTCACTATAGGcccggggc	---

Os trechos de anelamento com os oligonucleotídeos adaptadores universais estão representados em letras minúsculas.

### 3.3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total de *Ae. aegypti* foi extraído dos diferentes estágios larvais, pupas, ovos (5 dias após a postura) e de fêmeas adultas de 7 dias. Para as fêmeas adultas, indivíduos alimentados apenas com sacarose ou após 48 horas da alimentação sanguínea foram dissecados e o RNA foi obtido a partir de amostras do corpo gorduroso, do intestino e dos ovários, utilizando cerca de 10 disseções na obtenção da amostra total. O tempo de 48 horas após o repasto sanguíneo foi selecionado por ser o período em que um número considerável de transcritos variam seus níveis de acúmulo após a ingestão de sangue no mosquito em questão (DISSANAYAKE et al., 2010). Em todas as condições o RNA total foi extraído utilizando reagente TRIzol<sup>®</sup> (*Invitrogen*) e seguindo as instruções de uso fornecidas pelo fabricante. Após a extração do RNA total realizou-se a dosagem das amostras por espectrofotometria a 260 nm no espectrofotômetro de pequenos volumes *Nanodrop™ 2000C* (*Thermo Scientific*). Foi padronizada uma quantidade de 1 µg de RNA para síntese de todos os cDNAs. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*), segundo instruções fornecidas pelo fabricante, para um volume final de 20 µL de reação (2 µL do tampão RT Buffer 10×, 0,8 µL de dNTP (100 mM), 2 µL de oligonucleotídeos randômicos (*RT Random Primers 10×*) e 1 µL da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*), utilizando as seguintes condições na síntese: 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C.

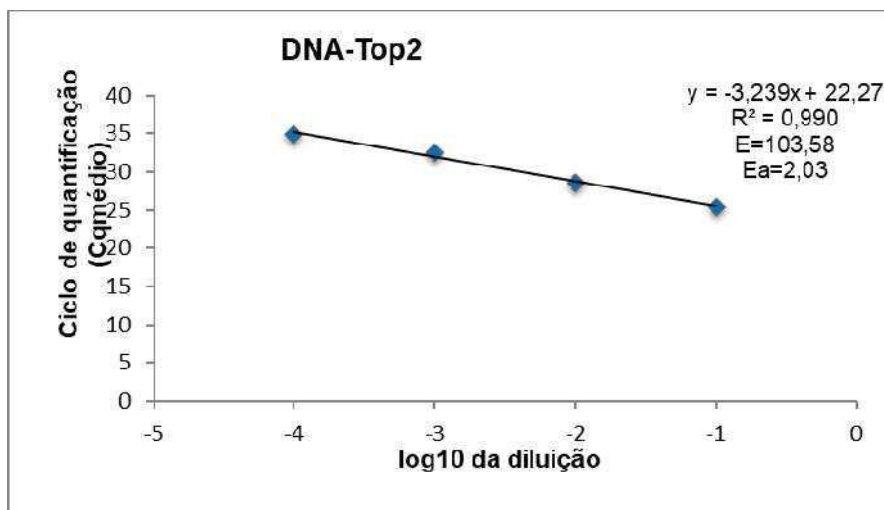
### 3.3.3 Determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores

Após a obtenção do cDNA, a eficiência da amplificação experimental em relação ao conjunto de oligonucleotídeos iniciadores para o cDNA do gene alvo (DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*) foi testada com as seguintes diluições do cDNA: 1:10, 1: 100, 1:1.000 e 1:10.0000. A curva de eficiência do gene normalizador S7 não foi incluída nesta sessão por ser uma condição experimental muito bem estabelecida no laboratório em questão.

Cada reação de RT-qPCR continha 15 µL de volume final, com 5 µL de cDNA diluído, 7,5 µL do reagente *SYBR<sup>®</sup> Green* (*Master Mix - Applied Biosystems*) e 0,75 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (concentração final de 250 nM). As reações foram

realizadas em um termociclador modelo *StepOnePlus™* (*Applied Biosystems*) usando as condições de RT-qPCR recomendadas pelo fabricante (20 segundos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 1 segundo e 20 segundos a 60 °C).

As curvas padrão foram obtidas por regressão linear empregando a média dos valores de Cq obtidos em triplicata para cada uma das diluições seriadas. A partir da curva, foi determinado diretamente o coeficiente angular e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). A eficiência de amplificação foi obtida pelo emprego da fórmula  $-1+10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$ . Foram considerados adequados conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores com eficiência de amplificação superior a 90% (demonstrado no gráfico representativo na figura 11).



**Figura 11. Ciclo de quantificação DNA topoisomerase II:** Curva padrão do ciclo de quantificação (Cq médio) para o conjunto de oligonucleotídeos selecionados para avaliação da expressão relativa nas amostras de cDNA de *Aedes aegypti* do presente estudo. A área do gráfico exibe a equação da reta com o valor de  $R^2$ , E = eficiência do par de oligonucleotídeos e Ea = Eficiência da amplificação. A análise foi realizada no programa Excel (v. 16.0).

#### 4.3.4 RT-qPCR para avaliação da expressão relativa

Para a amplificação em tempo real do cDNA, cada reação de RT-qPCR continha 15  $\mu$ L de volume final, com 5  $\mu$ L de cDNA na diluição de 1:10, 7,5  $\mu$ L de SYBR® Green

(*Master Mix – Applied Biosystems*) e 0,75 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (concentração final de 250 nM). O gene da proteína ribossomal S7 (RPS7) foi utilizado como controle endógeno da reação (sequência dos oligonucleotídeos na tabela 2). As reações foram realizadas em um termociclador modelo *StepOnePlus™* (*Applied Biosystems*) usando as condições de qPCR recomendadas pelo fabricante (20 segundos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 1 segundo e 20 segundos a 60 °C). A ciclagem convencional era seguida por um passo de aumento gradual da temperatura, com início a 45 °C com aumentos crescentes de 0,2 °C por segundo, para obtenção de uma curva de desnaturação (*melting*) do produto formado, de forma a verificar que um único produto foi amplificado.

O método de  $\Delta\Delta C_t$  comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado na análise das amostras obtidas de fêmeas do mosquito alimentadas com sacarose e fêmeas alimentadas com sangue, para avaliar as variações nos níveis de expressão do gene alvo, sendo a expressão de um gene referência usada como controle endógeno e o cDNA de uma condição controle especificado como calibrador (condição sacarose). Por esse método, a expressão relativa do gene alvo foi determinada pelo uso da fórmula  $R = 2^{-(\Delta C_q \text{ amostra} - \Delta C_q \text{ calibrador})}$ , na qual “R” é a expressão relativa, “ $\Delta C_q$  amostra” é a diferença entre os valores de  $C_q$  do gene alvo e do gene referência no cDNA testado e “ $\Delta C_q$  calibrador” é a diferença entre os valores de  $C_q$  do gene alvo e do gene referência no cDNA calibrador.

O método  $\Delta C_q$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) foi utilizado para as amostras que não empregavam a condição calibrador na análise (perfil da expressão relativa nos estágios do ciclo de vida e órgãos do mosquito). Os valores foram normalizados em relação ao mRNA do gene referência S7. Por este método, a expressão relativa foi determinada pelo uso da fórmula  $2^{-(\Delta C_q)}$ , onde  $R = 2^{-(C_q \text{ do gene referência}) - (C_q \text{ do gene alvo})}$ .

Para representação gráfica, os valores de erro padrão foram calculados com base nos dados de  $\Delta C_q$  (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001). Os valores de expressão relativa foram plotados e analisados com o programa Excel (v. 16.0) e cada gráfico gerado representa a média de pelo menos 3 replicatas biológicas, com quadriplicatas técnicas para cada amostra na análise.

A análise estatística dos dados de RT-qPCR foram realizadas com o programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 6. Para a comparação de fêmeas alimentadas com sacarose ou sangue foi utilizado o teste *t* de Student. Para as demais comparações foi utilizada a análise estatística não paramétrica com o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*.

### 3.4 Hibridização *in situ*

#### 3.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

As sequências de *Ae. aegypti* para gene da enzima DNA topoisomerase II e para o gene *oskar* (controle positivo do procedimento de hibridização) foram obtidas por meio de busca em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e <https://www.vectorbase.org/>). Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados e analisados conforme descrito no item 3.3.2. Os pares de oligonucleotídeos foram desenhados de forma a possuírem uma temperatura de anelamento ( $T_m$ ) entre 58 e 60°C, um conteúdo de GC de aproximadamente 50% e possuírem produtos previstos com um tamanho ótimo de 500 pb. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores confeccionados estão representadas no quadro 2.

#### 3.4.2 Preparo da sonda de RNA

As sondas de RNA empregadas no procedimento de hibridização *in situ* foram sintetizadas a partir de produtos de PCR obtidos em duas etapas. Inicialmente, a partir de 1µg de cDNA obtido de larvas (estágio 3) de *Ae. aegypti* foram feitas as primeiras reações de PCR para amplificação dos genes de interesse, utilizando pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos com adaptadores para inserção a 5' da região promotora da enzima T7 RNA polimerase (quadro 2). Os produtos dessas primeiras reações serviram como moldes para as segundas reações de PCR com oligonucleotídeos iniciadores universais contendo a região promotora da T7 RNA polimerase (quadro 2). Nessas segundas reações, que antecedem a síntese da sonda guia de RNA, combinamos os iniciadores do gene alvo com iniciador-*Universal forward* para confecção da sonda senso e iniciador *Universal reverse* para confecção da sonda antissenso.

Ambas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL com a enzima *GoTaq*<sup>®</sup> *G2 Flexi DNA Polymerase* (*Promega*), preparada nas seguintes

condições: 5 µL do tampão 5×, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e antissenso) a 10 µM, 0,3 µL de enzima (1,5 unidades), 1 µL do cDNA/molde e 15,7 µL de água ultra pura.

As reações foram submetidas à seguinte programação de temperaturas: desnaturação inicial por 2 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C; passo final de extensão de 5 minutos a 72 °C. As reações foram realizadas em um termociclador modelo *Veriti*<sup>TM</sup> (*Applied Biosystems*).

Para verificar o êxito das reações de PCR, os produtos de DNA amplificados eram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e em seguida corados em solução de 1 µg/mL de brometo de etídeo. A observação dos fragmentos amplificados se dava pela visualização de sua fluorescência sob trans-iluminação ultravioleta.

Os produtos finais amplificados, contendo as regiões promotoras da T7 RNA polimerase, eram purificados do gel de agarose com auxílio do kit comercial *Wizard*<sup>®</sup> *SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*) e o rendimento do procedimento da purificação era estimado por espectrofotometria a 260 nm no espectrofotômetro *Nanodrop*<sup>TM</sup> *2000C* (*Thermo Scientific*).

Em seguida sintetizamos uma sonda de RNA contendo um nucleotídeo modificado (digoxigenina) com o emprego do kit comercial *Maxiscript T7* (*AMBION*), de acordo as instruções fornecidas pelo fabricante e utilizando os produtos das segundas reações de PCR, descritas acima, como molde. As reações, com volume final de 10 µL, ocorreram através da incubação de 4 µL do produto de PCR purificado com reagentes do kit (1 µL de DIG RNA mix (nucleotídeos modificados com digoxigenina) da Roche, 1 µL de tampão de reação 10×, 1 µL de T7 RNA polimerase e 3 µL de água ultrapura) por 2 horas a 37 °C. Posteriormente as sondas foram precipitadas com 150 µL de etanol e acetato de amônio para concentração final de 0,5 M, durante aproximadamente 16 horas e ressuspendidas em um volume de 50 µL de tampão Hyb I (ver item 3.4.4) para armazenamento a -20 °C.

### **3.4.3 Preparo do tecido e reação de hibridização *in situ***

O procedimento empregado para a hibridização *in situ* foi baseado no protocolo descrito por Juhn e James (2012), com adaptações. Inicialmente, os ovários de fêmeas de



*Ae. aegypti* (após 36 horas da alimentação sanguínea) foram dissecados sob microscópio estereoscópico, em lâmina escavada com PBS 1× feito com água deionizada livre de contaminação com RNAses (composição no quadro 3). Após a dissecação, os ovários foram fixados dentro de microtubos de 1,5 mL (livre de contaminação com DNase e RNase) em fixador contendo paraformaldeído (PFA) 4% e heptano na proporção 1:1. A reação de fixação ocorreu por aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente os tecidos foram lavados 3 vezes (por 5 minutos cada vez) em tampão PBT, sob leve agitação. Em seguida realizou-se uma digestão proteica com proteinase-K a 0,01 mg/mL em PBT durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após a digestão foram feitas 2 lavagens (5 minutos cada) com PBT e os tecidos foram pós-fixados em PFA 4% em PBT por 30 minutos a temperatura ambiente. Ao término da pós-fixação foram realizadas 5 lavagens em PBT (5 minutos cada) e os tecidos foram equilibrados na proporção 1:1 com PBT e solução de hibridização I (Hyb-I) por 30 minutos a temperatura ambiente. Para o procedimento de pré-hibridização dos tecidos, a solução anterior era retirada cuidadosamente e era adicionado cerca de 1 mL de solução de hibridização II (Hyb-II) por tubo. Os tubos com as amostras eram então transferidos para o forno de hibridização modelo 23402 – *Big Shot III™* (Boekel Scientific) e mantidos a 55 °C por 30 minutos, sob leve rotação.

Em paralelo era realizada a desnaturação da sonda de RNA, por incubação por 5 minutos a 85 °C, seguida diretamente por incubação por 5 minutos em banho de gelo, estando a sonda pronta para uso. Ao final do procedimento de pré-hibridização, a solução Hyb-II era removida de forma que ficassem apenas 50 µL de solução em cada tubo. Eram então adicionados 2 µL das sondas nos tubos equivalentes. As sondas senso foram utilizadas como controles negativos das marcações. Após a adição das sondas, os tubos retornavam para o forno de hibridização a 55 °C e eram mantidos por aproximadamente 16 horas. Após esse período, a sonda era removida da amostra e eram realizadas 2 lavagens (5 minutos cada) com solução Hyb-I a 55 °C, com inversão dos tubos. Em seguida, era realizada uma nova incubação com a solução Hyb-I por 30 minutos a 55 °C. No passo seguinte, as amostras eram equilibradas na proporção de 1:1 Hyb-I e PBT por 15 minutos a temperatura ambiente e eram então realizadas 5 lavagens em PBT (5 minutos cada). Ao final do passo anterior as amostras eram mantidas a 37 °C por 30

minutos em 600  $\mu$ L de tampão PBT acrescido de RNase-A para concentração final de 10  $\mu$ g/mL, para remoção das fitas simples de RNA não hibridizado. Finalmente eram realizadas 3 lavagens (5 minutos cada) com PBT e a amostra era incubada em solução de bloqueio *Blocking Solution (Roche)*, na diluição de 1:5 em tampão PBT, por 30 minutos a temperatura ambiente.

#### **3.4.4 Reação pós-hibridização e detecção imunológica**

Após o bloqueio, os tecidos ovarianos eram incubados com anticorpo primário anti-digoxigenina conjugado à enzima fosfatase alcalina (*Anti-Digoxigenin-Alkaline Phosphate Fab fragments – Roche*) na diluição de 1:1000, em PBT. A incubação era feita a 4 °C durante aproximadamente 16 horas, sob leve agitação. Após esse período realizávamos 3 lavagens (10 minutos cada) com tampão PBT para remoção do anticorpo primário e, em seguida, as amostras eram lavadas 3 vezes (5 minutos cada) com o tampão alcalino (AP) (tabela 3), para alcalinizar o meio. Posteriormente eram adicionados 200  $\mu$ L do mix contendo NBT (*Nitro blue tetrazolium; Roche*) e BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; Roche*) em tampão AP para cada tubo, seguindo as instruções de uso do fabricante. Nesse procedimento, os tubos eram mantidos ao abrigo de luz. A progressão da marcação das sondas nos ovários era checada periodicamente com auxílio de um microscópio estereoscópico. Ao final, as reações eram interrompidas com adição 500  $\mu$ L de PBT. Os tecidos foram analisados e tiveram suas imagens registradas em microscópio estereoscópico, modelo M205FA (*Leica*).

**Quadro 3.** Soluções utilizadas na hibridização *in situ*.

<b>PBS (Tampão fosfato salino) 1×</b>
137 mM de cloreto de sódio 2,7 mM de cloreto de potássio 8 mM de fosfato de sódio dibásico 2 mM de fosfato de potássio monobásico Ajustar para 1 L em água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato)
<b>Fixador PFA: Heptano (1:1)</b>
4 gramas de paraformaldeído para 100 mL de PBS 1× (PFA 4%) Adicionar 1 volume de PFA 4% para 1 volume de heptano comercial
<b>PBT</b>
0,05% de Tween 20 em PBS 1 ×
<b>Tampão citrato de sódio salino 20 x (SSC)</b>
3 M de NaCl 0,3 M de citrato de sódio, pH 7,0
<b>Solução de hibridização I (Hyb I)</b>
50 mL de formamida 25 mL de SSC 20× 100 µL de Heparina (50 mg/mL) Ajustar para 100 mL em água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato)
<b>Solução de hibridização I (Hyb II)</b>
50 mL de Hyb I 500 µL de DNA de esperma de salmão (100 µL)
<b>Tampão alcalino (fosfatase alcalina -AP)</b>
0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,05 M de MgCl <sub>2</sub> 0,096 M de NaCl 0,2% de Tween 20

**3.5 Cultura de células embrionárias do mosquito *Aedes aegypti* (Aag2)**

A cultura de células Aag2 era mantida a 28 °C em meio Schneider para *Drosophila* contendo L-glutamina e bicarbonato de sódio (*Gibco*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Cultilab*) e sem adição de antibiótico na rotina de cultivo. A cada 6 dias em cultivo, uma garrafa de células confluentes (25 cm<sup>2</sup>) era submetida a duas lavagens com 1 mL de tampão PBS para remoção completa do meio antigo e, em seguida, as células eram descoladas através de incubação com 0,25% de tripsina (*Gibco*) diluída em PBS por

3 minutos a 37 °C. Após o descolamento da superfície da placa, as células eram ressuspensas em 5 mL de meio Schneider completo. As células em suspensão tinham sua densidade e viabilidade determinada por contagem em hemocítmetro (câmara de Neubauer) na presença do corante azul de tripan (*trypan blue* 0,04%; *Sigma-Aldrich*), técnica que permite distinguir as células mortas pela marcação com corante citado. Em cada passagem, eram transferidas  $1 \times 10^6$  células para uma garrafa nova com 5 mL de meio Schneider completo para manutenção do cultivo.

Os experimentos foram realizados sempre com cultivos entre a segunda e a quinta passagem após descongelamento. Também trabalhamos com uma semiconfluência aproximada de 60-70% de células em todos os experimentos, determinada de forma subjetiva pela análise visual de diferentes campos ao microscópio. Tal medida foi adotada para que a observação de possíveis alterações morfofisiológicas fosse realizada em um cultivo celular com características potencialmente proliferativas ao longo dos intervalos de tempo dos experimentos realizados.

### **3.6 Métodos colorimétricos**

#### **3.6.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

O método de MTT baseia-se num ensaio quantitativo que avalia uma função bioquímica crítica e característica de células vivas e metabolicamente ativas. Nesse ensaio as células viáveis convertem o brometo de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em cristais de formazana, através de redução, principalmente na mitocôndria, pela ação da enzima succinato desidrogenase (MOSMANN,1983). Enquanto o MTT consiste em um composto solúvel com coloração amarelada, os cristais de formazana são insolúveis e apresentam coloração arroxeada. Assim, determinamos através da colorimetria a função metabólica/mitocondrial, que se correlaciona diretamente com a viabilidade celular.

Para os ensaios de viabilidade celular por MTT, as células Aag2 eram plaqueadas com densidade inicial de 5.000 células por poço, em placas de 96 poços, e mantidas em cultivo padrão até que atingissem semiconfluência de 60-70%. As células eram então

incubadas com o inibidor etoposídeo (VP-16-213; *Sigma-Aldrich*) nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ , pelos períodos de 24 e 48 horas. Como controle negativo para o tratamento, as células eram tratadas com 0,25% do veículo (DMSO). Um controle contendo apenas meio de cultivo também era incluído no ensaio. Ao final de cada intervalo de tempo, a viabilidade celular era determinada pela adição de MTT (*Sigma-Aldrich*) diluído em tampão PBS para a concentração final de 0,5 mg/mL. As placas eram incubadas a 28 °C por 2 horas e ao abrigo de luz para permitir a redução metabólica do reagente MTT em formazana. Após transcorrido o tempo de reação, o meio era removido e eram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazana formados. Antes da leitura da absorvância, as placas eram centrifugadas em uma centrífuga Universal 320R (*Hettich*) a 1.000 g por 5 minutos para remoção de bolhas que pudessem interferir no caminho óptico do feixe de luz durante as leituras.

A quantificação da densidade óptica (DO) foi determinada no leitor de microplacas *Multiskan GO Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*), no comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração teste, havendo sido executados até seis experimentos independentes para determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$ . A ação do inibidor etoposídeo (VP-16-213) nas células Aag2 foi determinada pelo seguinte cálculo:

$$\%C = [(Ac-Am)] - (Ap-Am)] / (Ac - Am) \times 100$$

Onde %C = Ação do inibidor; Ac = absorvância registrada nos poços controle sem tratamento; Am = absorvância nos poços contendo somente meio de cultura; Ap = absorvância nos poços com tratamento. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  absolutos foram obtidos através da regressão não linear das curvas sigmóides de dose resposta para o etoposídeo, baseada no número total de células viáveis (normalizado em porcentagem) contra os valores logarítmicos das concentrações do inibidor no teste. A análise foi feita com o programa *GraphPad Prism*® 6.

### **3.6.2 Ensaio de proliferação celular (cristal violeta)**

Para o ensaio de proliferação celular foram tomados os intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas, empregando os mesmos protocolos de cultura e concentrações do inibidor etoposídeo citados para o teste de viabilidade com MTT (item 3.6.1).

Para investigar a capacidade de proliferação das células Aag2 tratadas com o etoposídeo, utilizamos o método do cristal violeta, descrito por Kueng, Silber e Eppenberger (1989), com adaptações para nossas condições experimentais. Neste teste, a exclusão do corante cristal violeta permite a avaliação da densidade das células em um poço ao marcar o DNA de suas células. Para tal, ao final de cada tratamento o meio era desprezado dos poços e as células eram lavadas com tampão PBS e posteriormente fixadas com etanol 100% por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o período de fixação, o etanol era removido e 100 µL de solução 0,05% do cristal violeta (*Sigma-Aldrich*) em etanol 20% eram adicionados em cada poço. As placas eram então incubadas por 10 minutos e, em seguida, lavadas sucessivamente com água destilada até que o líquido das lavagens estivesse bem claro e transparente. No último passo, os poços eram incubados com 100 µL de metanol absoluto por 5 minutos para ressuspensão e solubilização do corante de cristal violeta que estava impregnado nas células aderidas no fundo dos poços.

Nesse ensaio, considera-se que a absorbância adquirida por poço é diretamente proporcional à densidade de células no poço. A quantificação da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 595 nm foi determinada em leitor de microplacas *Multiskan GO Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração teste, respeitando a execução de três experimentos independentes para validação experimental.

A ação do inibidor etoposídeo (VP-16-213) sobre a proliferação das células Aag2 foi estimada com base nas médias dos valores de DO em cada condição experimental agrupada e também normalizada em porcentagem (com os poços não tratados correspondendo a 100%). A partir da normalização, os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA (*Multiple Comparisons*) e o pós-teste de Tukey-Kramer (*Tukey's Multiple Comparison Test*), onde todos os grupos foram comparados entre eles e ao controle não tratado. As análises foram feitas com o programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 6.

## 3.7 Análise morfológica das células Aag2

### 3.7.1 Marcação com DAPI

Para realização da marcação das células em cultura com o fluoróforo que evidenciam o núcleo, as células eram plaqueadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células por poço) sobre lamínulas redondas previamente tratadas com poli-L-lisina por cerca de 16 horas até a incubação com inibidor. As células eram então tratadas com etoposídeo (VP-16-213; *Sigma-Aldrich*) nas concentrações de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  pelos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Como controle negativo para o tratamento, as células eram tratadas com 0,25% do veículo (DMSO) e incubadas durante os períodos de tempo correspondentes. Após cada intervalo de tratamento as células eram lavadas 2 vezes com tampão PBS e fixadas com PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, sob leve agitação. Depois de fixadas, as células eram lavadas 3 vezes com tampão PBS (por 5 minutos cada) e em seguida era realizada uma incubação 5 minutos com a solução de marcação com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol; 1 mg/mL; *Roche*), na proporção de 1:5.000 em PBS. As incubações com o fluoróforo eram feitas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao final das marcações as lamínulas eram lavadas 5 vezes em tampão PBS, respeitando um tempo de 5 minutos para cada lavagem. Finalmente as lamínulas eram retiradas dos poços, com auxílio de uma pinça, para montagem em lâminas de vidro com o meio de montagem *Fluoroshield™* (*Sigma-Aldrich*). As imagens de fluorescência foram obtidas com filtros para DAPI em microscópio invertido de fluorescência modelo DMI4000 B (*Leica*), registradas com o programa Leica LAS AF Lite (v. 3.1) e posteriormente analisadas com o programa Image J (v. 1.46).

### 3.7.2 Histoquímica com hematoxilina e eosina

Para análise histoquímica, as células eram inicialmente plaqueadas, tratadas e fixadas como descrito no item 3.7.1. Após serem fixadas as células eram lavadas 3 vezes com tampão PBS (5 minutos cada lavagem). Após as lavagens das lamínulas, o procedimento de coloração das células ocorria com os seguintes passos: hidratação por 3 minutos em água destilada, coloração por 5 minutos com solução corante de hematoxilina 0,005%-*Sigma-Aldrich* (5g de hematoxilina; 50 mL de álcool 95%; 100 g de sulfato de

alumínio e potássio; 2,5 g de óxido de alumínio e água destilada para 1 L), realização de 3 lavagens rápidas em água destilada para remoção do excesso de hematoxilina, coloração por 2 minutos com a solução corante de eosina 0,0025%-*Sigma-Aldrich* (2,5 g de eosina; 200 mL de álcool 95%; 750 mL de álcool 80% e 50 mL de água destilada), desidratação crescente por imersões sucessivas de 30 segundos em soluções de etanol 70%, 80%, 90% e 100% e finalmente clarificação da amostra por imersões sucessivas de 5 segundos em xilol I, II e III. Após o último passo as lâminas eram montadas com o meio de montagem permanente *Entellan*<sup>®</sup> (*Sigma-Aldrich*). As imagens histológicas foram registradas no microscópio óptico modelo Eclipse 80i (*Nikon*), usando o programa *Imaging Software- NIS Elements* (v. 3.22) e analisadas com o programa *Image J* (v. 1.46)

### **3.8 Análise do ciclo celular e apoptose nas células Aag2**

#### **3.8.1 Marcação celular com anexina-V e iodeto de propídeo (PI)**

A determinação da morte celular por apoptose foi realizada com o emprego do kit comercial *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (*Roche*), que permite detecção de apoptose e necrose em nível celular e de forma direta. Através da marcação direta da proteína anexina-V conjugada a fluoresceína (Anexina-V-Fluo) juntamente com o iodeto de propídeo (PI). Pela dupla marcação de anexina V e PI podemos diferenciar a morte por apoptose nos seus estágios iniciais da morte por necrose pela marcação nuclear com PI.

A solução de uso com os marcadores fluorescentes era preparada imediatamente antes do uso e ao abrigo da luz. A solução de incubação era preparada pela diluição da solução de Anexina-V-Fluos no tampão de incubação do kit (tampão HEPES), seguindo a proporção recomendada de 1:50. Posteriormente a solução concentrada de PI era adicionada à solução, também na proporção de 1:50. Após homogeneização a solução de marcação estava pronta para uso.

As células que foram utilizadas nesta análise foram previamente plaqueadas sobre lamínulas como descrito no item 3.7.1. Neste ensaio apenas as concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  do inibidor etoposídeo (VP-16-213) foram utilizadas para os tempos de 6, 12, 18, 36 e 48 horas. Ao final do tempo de tratamento, o meio com inibidor era descartado e as células eram lavadas 2 vezes com tampão PBS. Então as células eram



incubadas com 50  $\mu$ L da solução de marcação por 15 minutos a 20 °C e ao abrigo da luz. Após a incubação, as imagens de fluorescência das células foram obtidas com filtros para fluoresceína e PI em um microscópio invertido de fluorescência modelo DMI4000 B (*Leica*), registradas com o programa *Leica LAS AF Lite* (v. 3.1) e posteriormente analisadas com o programa *ImageJ* (v. 1.46).

### 3.8.2 Ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose

Para avaliação da morte por apoptose, as células Aag2 foram plaqueadas a  $2 \times 10^7$  células por poço em placas de 6 poços e incubadas com inibidor etoposídeo (VP-16-213) nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu$ M, pelos períodos de tempo de 48 e 96 horas. Após a etapa de incubação as placas eram colocadas sobre gelo e os sobrenadantes eram transferidos para tubos de fundo cônico de 15 mL. Então 2 mL de uma solução gelada de PBS 1 $\times$ :EDTA 5 mM (6:4) eram adicionados às células por 10 minutos. Em seguida as células eram cuidadosamente raspadas e transferidas para o mesmo tubo cônico de 15 mL. As células eram centrifugadas a 1.000 g, por 10 minutos a 10 °C em uma centrífuga modelo Universal 320R (*Hettich*) e o sobrenadante era descartado. Os precipitados formados eram lavados 2 vezes com tampão PBS gelado e as amostras eram ressuspendidas em 700  $\mu$ L de tampão de lise (10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 5 mM EDTA; 0.2% Triton X-100), sendo então incubadas por 20 minutos em gelo. Após a etapa de lise, as amostras eram centrifugadas por 20 minutos a 22.000 g a 10 °C e os sobrenadantes eram submetidos a uma etapa de desproteinização por extração com fenol:clorofórmio. Resumidamente, os sobrenadantes da etapa anterior eram transferidos para tubos novos contendo o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1). As amostras eram então misturadas por inversão e centrifugadas por 1 minuto a 14.000 g a 10 °C. Após a centrifugação eram coletadas apenas as fases aquosas das amostras (contendo o DNA) e a extração com fenol:clorofórmio era repetida mais uma vez. Por fim as fases aquosas contendo DNA eram transferidas para tubos novos contendo o mesmo volume de clorofórmio. As amostras eram também misturadas por inversão e centrifugadas por 1 minuto a 14.000 g a 10 °C. Após a centrifugação as fases aquosas das amostras eram transferidas para novos tubos com NaCl para concentração final de 0,15 M e acrescidas do mesmo volume de isopropanol. O DNA era deixado para precipitar a -20 °C por aproximadamente 16 horas. Após a precipitação do DNA, as amostras eram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 g a

10 °C, o isopropanol era descartado por inversão do tubo e os precipitados lavados com etanol 70%. Era então realizada uma nova centrifugação, como no passo anterior. Posteriormente os precipitados contendo DNA eram ressuspensos em 35 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA). Ao final da extração as amostras eram tratadas com de 1 µL de RNase-A (10 mg/ml) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Os DNAs purificados foram quantificados por leitura da absorvância a 260 nm no espectrofotômetro de pequenos volumes *Nanodrop™ 2000C (Thermo Scientific)*, utilizando 10 µg de cada amostra para aplicação em gel de agarose 1.8%, submetidas a eletroforese em tampão TAE 1×, com voltagem constante de 30 V por até 8 horas, para melhor separação dos fragmentos menores de DNA. Para avaliação do perfil de fragmentação do DNA, o gel foi corado em solução de 1 µg/mL de brometo de etídeo e a observação do DNA se deu pela visualização de sua fluorescência sob trans-iluminação ultravioleta. As imagens foram registradas em um equipamento fotodocumentador. Para validação experimental, os procedimentos mencionados foram realizados 3 vezes de forma independente.

### **3.8.3 Citometria de fluxo**

#### **3.8.3.1 Tratamento e preparação das células para a citometria de fluxo**

Para análise dos efeitos do etoposídeo na progressão do ciclo celular, as células eram plaqueadas em placa de 6 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço) até atingirem um estado de semiconfluência, sendo então incubadas com o inibidor etoposídeo nas concentrações de 10, 50 e 100 µM, pelos períodos de 6, 18, 36 e 48 horas (em triplicata). Após cada intervalo de tratamento, o meio de cultivo dos respectivos poços era descartado e as células aderidas eram descoladas com a adição de 500 µL de PBS contendo 0,25% de tripsina, seguido de incubação a 37 °C por 4 minutos. As células eram então ressuspensas no próprio poço em 3 mL de PBS contendo 5% de soro fetal bovino. Em seguida as células eram transferidas para tubos de 15 mL, centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes eram descartados. Os precipitados eram então lavados com 1 mL de PBS 1×, e realizávamos uma nova centrifugação nas condições anteriores. Após o procedimento de lavagem, os precipitados eram

ressuspendidos em 500 µL de PBS 1× e uma alíquota desse volume era utilizada para contagem em câmara de Neubauer. Com base na contagem, a densidade celular em todos os tubos era ajustada para  $5 \times 10^5$  células/mL. As células eram então fixadas por incubação em PBS 1× contendo 2% de PFA por 20 minutos, sendo então novamente centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos a temperatura ambiente e o precipitado era lavado duas vezes em tampão PBS 1×. Por fim,  $5 \times 10^5$  células eram incubadas em 500 µL de tampão de ciclo celular (3,4 mM Tris-HCl pH7,6; 10 mM NaCl; 0,1% NP40; 0,7 U/mL RNase-A e 75 µM iodeto de propídio/PI) por 2 horas a 37 °C, para marcação com iodeto de propídeo ao DNA. As amostras eram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo.

### 3.8.3.2 Operação do citômetro de fluxo

Dentre outras aplicações, a técnica da citometria de fluxo, ao detectar e quantificar a incorporação do fluoróforo intercalante iodeto de propídio (PI) ao DNA, permite classificar individualmente as células de uma determinada população nos diversos estágios do ciclo celular (G1/G0, S, G2/M) e também no processo apoptótico. Essa técnica permite ainda quantificar o total de células em cada estágio e assim obter um panorama da progressão do ciclo celular de uma população total sob estudo, permitindo também a detecção de atrasos, bloqueios ou paradas em determinados pontos do ciclo (DARZYNKIEWICZ; HUANG, 2004).

Para a análise por citometria das células marcadas com iodeto de propídeo (item 3.8.3.1), os parâmetros operacionais foram configurados no programa *FlowJo* baseados na quantificação da fluorescência presente no DNA marcado com PI no interior das células. Selecionamos o laser de argônio (FL2) pela especificidade da faixa limite para fluorescência emitida (excitação do PI em 617 nm, na cor vermelha). Utilizamos então a amostra controle para estabelecer um padrão de detecção para todas as leituras posteriores no citômetro. Em seguida, nos protocolos de *gating*, ajustamos o equipamento para aquisição de 10.000 eventos por população de células analisada. Por fim, as funções de ganho, compensação e limiar (*threshold*) eram ajustadas com base nas características da amostra, a fim de obtermos uma separação melhor das células por fase do ciclo celular, representada pela intensidade de fluorescência em escala linear. Após essa etapa

de ajuste e configuração do programa de análise ao perfil da amostra controle, as leituras das demais amostras eram realizadas.

Nos ensaios de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento *Cytek*<sup>®</sup>, N/S E3591 (modelo *FACS Calibur xP5*). As análises dos dados foram realizadas no programa *FlowJow Collector's Edition* (v. 1.6.0\_33-b05) e os resultados foram representados graficamente em histogramas, onde o eixo horizontal representa a quantificação do PI incorporado ao DNA e o eixo vertical representa o número de células contabilizado pelo equipamento. Os experimentos foram realizados duas vezes de forma independente, em quadruplicata.

### **3.9 Ensaio da atividade enzimática da DNA topoisomerase do tipo II em células Aag2**

#### **3.9.1 Extração de proteínas nucleares de células Aag2**

O procedimento para obtenção dos extratos de proteínas nucleares de células Aag2 foi adaptado do protocolo de preparação de extratos em pequena escala otimizado para células HeLa, descrito no manual do kit comercial *Human Topoisomerase II Assay Kit (TopoGEN; CO, EUA)* e adaptado do protocolo original de Robert e colaboradores 1995.

Para a extração de proteínas nucleares, as células eram previamente plaqueadas em placa de 6 poços ( $2 \times 10^7$  células por poço) sem adição do inibidor etoposídeo. Após a aderirem e atingirem aproximadamente 70-80% de confluência, as células eram lavadas duas vezes com tampão PBS 1× e descoladas com 1 mL de tampão PBS 1× gelado contendo 5 mM de EDTA, na proporção 6:4 (suspensão celular:PBS/EDTA). Em seguida as suspensões com células provenientes de 3 poços eram agrupadas, transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL e incubadas por 10 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, as células eram centrifugadas a 1.500 g por 3 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes eram descartados e os precipitados formados eram ressuspensos lentamente em 2 mL do tampão TEMP gelado (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM PMSF). As amostras eram então centrifugadas e ressuspensas da mesma forma que no passo anterior, sendo então incubadas por 10 minutos em banho de gelo. Ao final desta incubação as amostras eram transferidas para o recipiente de vidro de um homogeneizador do tipo Dounce e as membranas plasmáticas celulares eram rompidas (mecanicamente) com cerca de 6 a 8 pulsos manuais no Dounce, em banho de

gelo (após essa etapa os núcleos ainda encontravam-se íntegros, preservando o conteúdo de proteínas nucleares). Em seguida as amostras eram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação os sobrenadantes eram descartados e obtínhamos as frações nucleares nos precipitados. Os precipitados eram então ressuspensos lentamente em tampão TEP (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,5 mM PMSF) e repetia-se o passo da centrifugação anterior. Ao final da centrifugação os precipitados eram ressuspensos em um volume menor de tampão TEP (esse volume devia ser equivalente a até 4 volumes dos precipitados formados), onde eram adicionados a cada tubo volumes iguais de NaCl 1 M e 2 µL de um coquetel de inibidores de proteases (*Sigma-Aldrich*). Nesse passo ocorria a lise osmótica das membranas nucleares para obtenção dos extratos nucleares. Em seguida as amostras eram homogeneizadas em agitador do tipo vortex e incubadas por 60 minutos em banho de gelo, para garantir a conservação *in natura* das proteínas durante o tempo de lise. Ao término da incubação as amostras eram centrifugadas por 15.000 g por 20 minutos a 4 °C, os sobrenadantes eram recolhidos e a quantidade de proteína dos extratos era determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A melhor forma armazenamento das amostras foi em banho de gelo (~0 a 4 °C), mantido dentro de geladeira por até 6 dias. Era ainda necessário trocar o banho de gelo diariamente por todo período de armazenamento. Outras formas de condicionamento das amostras foram testadas, como congelamento dos extratos nucleares puros a -70 °C, a -20 °C e também na presença de glicerol na proporção de 1:1 (extrato nuclear: glicerol) a -70 °C e a -20 °C. Porém todas essas preparações demonstram perda da atividade da enzima no processo de descongelamento e até mesmo a presença de glicerol na proporção empregada demonstrou ter influência negativa no desempenho da reação enzimática quando comparados ao armazenamento dos extratos preservados *in natura* entre 0 e 4 °C. A partir do sétimo dia de armazenamento, a atividade dos extratos mantidos em geladeira era reduzida, passando-se a gerar um padrão de decatenação do kDNA menos efetivo e reproduzível.

### **3.9.2 Ensaio de decatenação de kDNA como forma de determinar especificamente a atividade de DNA topoisomerases do tipo II**

Uma atividade exclusiva das enzimas DNA topoisomerases do tipo II consiste no desenlace ou decatenação de DNAs entrelaçados (ou concatenados), que ocorre graças à clivagem em fita dupla que essas enzimas fazem no DNA alvo. Para avaliar *in vitro* essa atividade, poucos ensaios são tão eficientes quanto o ensaio de decatenação de DNA de cinetoplasto (kDNA). O kDNA é um tipo especial de DNA mitocondrial encontrado em tripanossomatídeos e que consiste de moléculas circulares denominadas minicírculos e maxicírculos. O cinetoplasto consiste em uma região da mitocôndria onde uma grande quantidade desses círculos se encontram altamente interconectados ou concatenados, formando uma malha densa e compacta de DNA. Os círculos do kDNA podem ser separados dessa malha, *in vivo* e *in vitro*, pela atividade das enzimas topoisomerases do tipo II (mas não pelas do tipo I). No presente trabalho foi empregado o kit comercial *Human Topoisomerase II Assay Kit (TopoGEN; CO, EUA)*, que usa kDNA purificado de *Crithidia fasciculata* para avaliar a atividade de enzimas topoisomerases do tipo II em extratos de proteínas nucleares.

Para os ensaios de decatenação do kDNA eram montadas reações com volume final de 10  $\mu$ L em microtubos de 0,6 mL, sendo mantidas em banho de gelo durante sua preparação. Em cada reação eram adicionados 3,5  $\mu$ L de água deionizada, 1  $\mu$ L do tampão A (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 1,5 M NaCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM ditioneitol/DTT e 300  $\mu$ g/mL de albumina sérica bovina/BSA) e mais 1  $\mu$ L do tampão B (10 $\times$  ATP, contendo apenas 20 mM de ATP), obedecendo sempre a relação (1:1) desses tampões na reação. Em seguida eram adicionados 0,5  $\mu$ L de kDNA (20  $\mu$ g/ $\mu$ L) e, por último, 4  $\mu$ L do extrato nuclear diluído em tampão TEP (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,5 mM PMSF). Diversas diluições dos extratos nucleares em tampão TEP (1:10, 1:50, 1:100) foram avaliadas nos primeiros testes e essas diluições foram necessárias devido à alta concentração de sal (0,5 M de NaCl) presente na extração final e também para garantir uma melhor solubilidade das proteínas na reação, considerados fatores que influenciam na atividade ótima da enzima ao longo do ensaio (HALDANE; SULLIVAN, 2001). Ao final do preparo, as reações eram homogeneizadas e os tubos incubados a 37 °C por 30 minutos em banho-maria. As reações eram paradas com a adição de 2  $\mu$ L de solução de parada/tampão de carregamento (5% de sarcosil; 0,125% azul de bromofenol e 25% de glicerol). Os volumes totais de cada reação eram aplicados em gel de agarose 1% e submetidos à eletroforese em tampão TAE 1 $\times$  com voltagem constante de 50 V por 50

minutos. Em seguida os géis eram corados com brometo de etídeo, visualizados sob trans-iluminação ultravioleta e fotodocumentados para registro e análise dos dados. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes para as condições realizadas.

### **3.9.3 Padronização e análise do perfil de decatenação do kDNA pelo extrato nuclear de células Aag2**

Para determinarmos o perfil de atividade das enzimas DNA topoisomerases do tipo II presentes no extrato nuclear das células do mosquito *Ae. aegypti* submetemos os extratos brutos a diferentes condições: (i) Diferentes concentrações de proteínas nucleares; (ii) Diferentes concentrações de ATP (cofator da enzima); (iii) Incubação com diferentes concentrações do inibidor etoposídeo (VP16-213).

(i) Para análise da influência da concentração de proteínas na atividade enzimática, ensaio descrito no item 3.9.2 foi realizado para as seguintes concentrações finais de proteínas: 0,15, 0,3, 0,6, 0,75, 1,0 e 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os extratos foram diluídos em tampão TEP e 4  $\mu\text{L}$  de extrato nuclear eram usados por ensaio.

(ii) Para determinar a dependência de ATP para a atividade de decatenação do kDNA, os extratos nucleares foram submetidos a um teste na presença das seguintes concentrações finais de ATP: 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 e 2,0 mM e também a ausência desse cofator. Para o preparo das respectivas reações eram utilizados 4  $\mu\text{L}$  de extrato nuclear a 0,75  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e foram seguidos os passos descritos no item 3.9.2, fazendo apenas ajustes no uso do tampão B 10 $\times$  (ATP 20 mM). No preparo da reação sem ATP, foi aplicado tampão TEP no lugar do tampão B 10 $\times$ .

(iii) Para determinar que o etoposídeo (VP16-213) é capaz de inibir a atividade da enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*, extratos nucleares de células Aag2 foram submetidos a ensaios com as seguintes concentrações de etoposídeo nas reações: 1, 10, 50, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  e também com apenas 0,2% do veículo dimetilsulfóxido (DMSO; reação controle). As reações foram previamente preparadas como descrito no item 3.9.2 sem adição do inibidor e incubadas inicialmente por 5 minutos a 37 °C em banho-maria. Após esse período de incubação inicial o inibidor foi adicionado nas suas respectivas concentrações e as reações foram incubadas por mais 25 minutos a 37 °C em banho-maria.

### 3.10 Filogenia molecular

#### 3.10.1 Alinhamento múltiplo

As sequências peptídicas previstas das enzimas DNA topoisomerase II de diversos metazoários, assim como a sequência da enzima da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram adquiridas por meio de buscas de similaridade do tipo *blastp* no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia dos Estados Unidos – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Utilizamos a sequência peptídica da DNA topoisomerase II de *Drosophila melanogaster* (NP\_476760) como referência para a busca por similaridade contra sequências de organismos selecionados. Para assegurar a qualidade dos dados trabalhados, as sequências peptídicas foram obtidas especificamente do banco de dados *RefSeq* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), que contem sequências que já passaram por processos mais rigorosos de anotação funcional. Foram selecionadas para alinhamento e análises filogenéticas apenas as sequências que apresentaram mais de 60% de similaridade ao longo de sua extensão com a enzima de *D. melanogaster*. As sequências foram alinhadas com o programa ClustalX (v. 2.0), empregando os parâmetros padrão do *software* para alinhamentos múltiplos e o alinhamento resultante foi salvo no formato “.fasta”.

#### 3.10.2 Método de distância (*Neighbour-Joining*)

Uma análise evolutiva foi realizada a partir do alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas descrito no item 3.10.1. A reconstrução filogenética foi conduzida de forma independente com dois métodos que se baseiam em princípios distintos de reconstrução filogenética. Primeiramente foi empregado o algoritmo de *Neighbour-Joining* ou agrupamento de vizinhos (SAITOU; NEI, 1987), que consiste em um método computacionalmente rápido que realiza comparações par a par entre táxons representados em uma matriz de distâncias evolutivas geradas a partir das divergências entre as sequências de um alinhamento múltiplo. O algoritmo se inicia com uma árvore totalmente politômica (ou estrelada) e promove uma união ou agrupamento progressivo das sequências/táxons com menores distâncias em novos táxons, eliminando continuamente a politomia da árvore e estimando uma árvore que seja um reflexo mais fiel possível da matriz de distâncias evolutivas original. O algoritmo de *Neighbour-Joining*



foi executado conforme implementado pelo programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X - MEGA X* (v. 10.0.5; KUMAR et al., 2018). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson e as lacunas ou *gaps* no alinhamento foram tratadas utilizando a opção de deleção par a par (*pairwise deletion*). Na árvore resultante, representada em escala, o comprimento de cada ramo é proporcional ao número de substituições de aminoácidos por sítio. Para validação estatística, foram analisadas 1.000 replicatas de reamostragens por *bootstrap* e o maior percentual de vezes em que um mesmo grupo de sequências era agrupado nas replicatas encontra-se representado na base de cada nó. A sequência polipeptídica da DNA topoisomerase II da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi escolhida como grupo externo e utilizada para enraizar a árvore.

### **3.10.3 Método de máxima parcimônia**

Para realizar a inferência filogenética, foi também empregado o método de máxima parcimônia, que busca uma árvore que possa explicar a evolução das sequências alinhadas empregando o menor número de passos evolutivos. Pelo princípio da máxima parcimônia, a árvore cuja topologia implica o menor número mudanças para explicar as substituições de aminoácidos nos sítios informativos presentes em um alinhamento múltiplo deve ser considerada como sendo a melhor hipótese filogenética para explicar o cenário evolutivo em questão. Esse método foi também executado conforme implementado pelo programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X - MEGA X* (v. 10.0.5; KUMAR et al., 2018). A obtenção da árvore de máxima parcimônia foi realizada utilizando o algoritmo heurístico *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR - NEI; KUMAR, 2000), com o parâmetro de nível de busca 1, no qual as árvores iniciais da análise são obtidas por uma adição randômica de sequências (10 replicatas). Todas as lacunas ou *gaps* no alinhamento foram eliminadas da análise (opção de deleção completa). Foi permitida a retenção de um máximo de 500 árvores mais parcimoniosas e uma árvore consenso foi estabelecida a partir da frequência dos agrupamentos no conjunto retido. O comprimento dos ramos foi calculado na árvore consenso empregando o método do caminho médio (*average pathway*, NEI; KUMAR, 2000). Na árvore resultante, representada em escala, o comprimento de cada ramo é proporcional ao número de mudanças ao longo de sua sequência. Para validação estatística, foram analisadas 1.000 replicatas de

reamostragens por *bootstrap* e o maior percentual de vezes em que um mesmo grupo de sequências era agrupado nas replicatas encontra-se representado na base de cada nó. A sequência polipeptídica da DNA topoisomerase II da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi escolhida como grupo externo e utilizada para enraizar a árvore.

### 3.11 Modelagem por homologia

#### 3.11.1 Bancos de dados utilizados

-*National Center for Biotechnology Information* (NCBI)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): utilizado na busca de estruturas primárias da proteína e sequências gênicas no formato fasta.

-*Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>): utilizado na busca de estruturas tridimensionais de proteínas e informações relacionadas às estruturas depositadas (ex: resolução). Fornecendo estruturas que podem ser utilizadas como molde na modelagem comparativa.

#### 3.11.2 Alinhamento de sequências e modelagem comparativa

Com a sequência peptídica prevista da enzima DNA topoisomerase II de *Aedes aegypti*(XP\_001656142.2), foi realizada uma busca do tipo *blastp* no NCBI com o objetivo de encontrar moldes para os cálculos de modelagem comparativa. O molde 3QX3 (obtido pelo método de difração de raios-X, com resolução de 2,16 Å) correspondente ao cristal da isoforma  $\beta$  da proteína DNA topoisomerase II de humanos-TopII $\beta$  (WU et al., 2011), foi escolhido por possuir a melhor resolução e por conter o inibidor etoposídeo (VP-16) co-cristalizado, depositado no PDB. No passo seguinte foi realizado o alinhamento entre a sequência de aminoácidos da proteína do *Ae. aegypti* e a sequência de aminoácidos da estrutura molde 3QX3 (modelo) no servidor *Praline* (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>). Além do alinhamento convencional de sequências, este servidor possui opções para otimizar as informações de cada sequência de entrada (ex. o alinhamento pode ser estendido pela homologia da estrutura secundária prevista) (SIMOSSIS; HERINGA, 2005). A partir dos dados obtidos (*output*) no servidor *Praline* foi realizada a modelagem comparativa no servidor *Swiss-Model*

(<https://swissmodel.expasy.org/>), que produz um alinhamento entre a sequência alvo e a depositada no banco de dados de proteínas (PDB) e realiza a construção de um modelo da proteína alvo com base nesse alinhamento (WATERHOUSE et al., 2018). Por fim, a estrutura do modelo construído foi alinhada com o molde e as coordenadas espaciais da dupla fita de DNA em complexo com o molde foram copiadas e inseridas no modelo.

### **3.11.3 Otimização e validação do modelo tridimensional**

O modelo construído foi submetido a três procedimentos de refinamento estrutural no servidor *ModRefiner* (*High Resolution Protein Structure Refinement*; <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>). O refinamento da estrutura tridimensional do modelo predito foi realizado para aliviar possíveis contatos interatômicos desfavoráveis (XU; ZHANG, 2011), uma vez que a proteína funcional deve ser termodinamicamente mais estável. O *ModRefiner* testa virtualmente as diferentes possibilidades de posicionamento dos átomos na estrutura, promovendo uma busca conformacional para obtenção de estruturas de menor energia. Dessa forma, o servidor forneceu um modelo refinado para cada modelo bruto obtido pelo *Swiss-Model* fornecido.

### **3.11.5 Avaliação da qualidade geral do modelo construído**

A validação global da estrutura do modelo construído foi realizada no servidor *ProSA-web* (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), que realiza avaliações através dos métodos do *Z-Score* e do perfil de energia. O método do *Z-Score* permite a avaliação da qualidade geral do modelo construído por comparação dos resultados obtidos com estruturas tridimensionais de proteínas disponíveis no PDB e que foram obtidas e elucidadas por métodos experimentais, como a difração de raios X de cristais e a ressonância magnética nuclear. No método do *Z-Score*, a qualidade do modelo é confirmada através da sua posição em uma faixa azul do gráfico (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). O método do gráfico de energia do programa *ProSA-Web* oferece uma estimativa da qualidade local do modelo em função da posição dos resíduos de aminoácidos na sequência proteica (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Ao final das validações, a estrutura do modelo resultante foi visualizada graficamente no programa *PyMol* (v.2.4.0a0; <https://pymol.org/2/>) (SCHRÖDINGER, 2015).

### 3.11.4 Análise do modelo pelo gráfico de Ramachandran

Os parâmetros geométricos da estrutura foram validados no servidor *Rampage* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), que gerou o gráfico de Ramachandran, o qual representa todos os ângulos diedros phi ( $\varphi$ ) e psi ( $\psi$ ) de cada resíduo de aminoácido que compõe as proteínas. Nelas, esses ângulos são diretamente correlacionados com sua conformação tridimensional, estando sujeitos a uma série de restrições associadas principalmente às estruturas secundárias das quais fazem parte. Contextualizando, a representação gráfica de Ramachandran permite avaliar a qualidade do posicionamento dos resíduos de aminoácidos da estrutura tridimensional predita e refinada nas etapas anteriores. A partir da análise desses ângulos, verifica-se se existe posicionamento energeticamente desfavorável dos resíduos de aminoácidos, o que reduziria a estabilidade da estrutura proteica. O programa *Rampage* (LOVELL et al., 2003) posiciona os aminoácidos no gráfico de acordo com os ângulos  $\varphi$  e  $\psi$ , fornecendo a porcentagem dos que se encontram em regiões permitidas, favoráveis e não permitidas, a partir dos modelos refinados fornecidos. Assim, os modelos preditos selecionados para serem submetidos à etapa seguinte foram os que apresentaram maior porcentagem de resíduos localizados em regiões permitidas (MANNIGE; KUNDU; WHITELAN, 2016).

### 3.11.6 Redocking e Docking molecular

Os estudos de ancoramento molecular (*docking*) foram realizados com o programa *GOLD* (v 5.7.0; JONES et al., 1997), a estrutura do inibidor etoposídeo (VP-16) foi construída e analisada no programa *Avogadro* (v.1.2.0; HANWELL et al., 2012) e sua geometria molecular foi otimizada pelo método semi-empírico PM3, utilizando o programa *Gaussian 03W* (v.6.0; FRISCH et al., 2004). Antes da realização dos estudos *dedocking* do modelo AeTop2 com o inibidor etoposídeo, foi realizado uma etapa de *redocking* molecular, que consiste em uma metodologia que visa recuperar computacionalmente a posição original de um ligante na estrutura do complexo proteína-ligante elucidado experimentalmente. Portanto, o procedimento de *redocking* é utilizado para validar o *docking* molecular. Os parâmetros estabelecidos para o estudo do *docking* foram determinados pelas análises das poses obtidas pelos cálculos de *redocking*, nas quais a melhor solução de *redocking* é representada pelo menor valor do desvio da raiz média quadrática (RMSD- *Root Mean Square Deviation*). Assim, para o estudo de *docking*, foram utilizadas as funções de *score*, *Chemscore*, *ChemPLP* e *Goldscore*, com o raio de

busca variando entre 10 e 20 Å de distância em torno do átomo de nitrogênio do resíduo catalítico Arg503 (id426 e 5993 para as cadeias A e B, respectivamente). A inspeção visual das interações intermoleculares e as representações gráficas foram realizadas no programa *PyMOL*(v.2.4.0a0) e *BIOVIA Discovery Studio* (v.16.1.0.15350).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação do gene da enzima DNA topoisomerase II de *Aedes aegypti*

#### 4.1.1 Identificação do gene de uma DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*

Inicialmente utilizamos a sequência peptídica da enzima topoisomerase 2 da mosca *Drosophila melanogaster*, depositada no banco de dados do NCBI/NIH (código de acesso NP476760), como referência para a busca por similaridade tipo *tblastn* contra sequências nucleotídicas do genoma do mosquito *Ae. aegypti* (cepa LVP AGWG) depositadas no banco de dados *vector base* (<http://vectorbase.org>). A busca retornou apenas um *locus* com alto nível de identidade para DNA topoisomerase II no genoma do mosquito (71,7% de identidade ao longo de 1289 resíduos alinhados), localizado no segmento 2q24 do braço longo do cromossomo 2 de *Ae aegypti* (localização: 327992549-327996409, geneAAEL018244). A mesma sequência encontra-se depositada no banco de dados de sequências referência (*RefSeq*) do NCBI sob os códigos XM001656092 (para a sequência nucleotídica) e XP001656142 (para a sequência peptídica prevista).

O gene da enzima DNA topoisomerase de *Ae. aegypti* possui uma fase aberta de leitura de 4524 pb, codificando uma cadeia polipeptídica de 1507 aminoácidos com massa molecular prevista de 171,016 kDa. No alinhamento múltiplo da figura 12 podemos observar um alto grau de identidade entre as sequências de *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* e *H. sapiens* alinhadas, sendo evidenciado através da edição de cores por resíduos de aminoácidos ao longo das proteínas. Neste alinhamento de sequência podemos identificar as regiões da proteína que compõe os domínios funcionais, GyrB e GyrA, a conservação do resíduo essencial de tirosina (Y) 82 que se liga ao DNA durante o ciclo catalítico da proteína. Observando as sequências podemos notar substituições de resíduos no sítio de dimerização, além de pequenas variações ao longo do alinhamento. Segundo o programa *PSORT II* (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) a enzima de *Ae aegypti* tem uma probabilidade de 82,6% de apresentar localização subcelular no compartimento nuclear. De acordo com o programa *cNLSMapper* ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) a

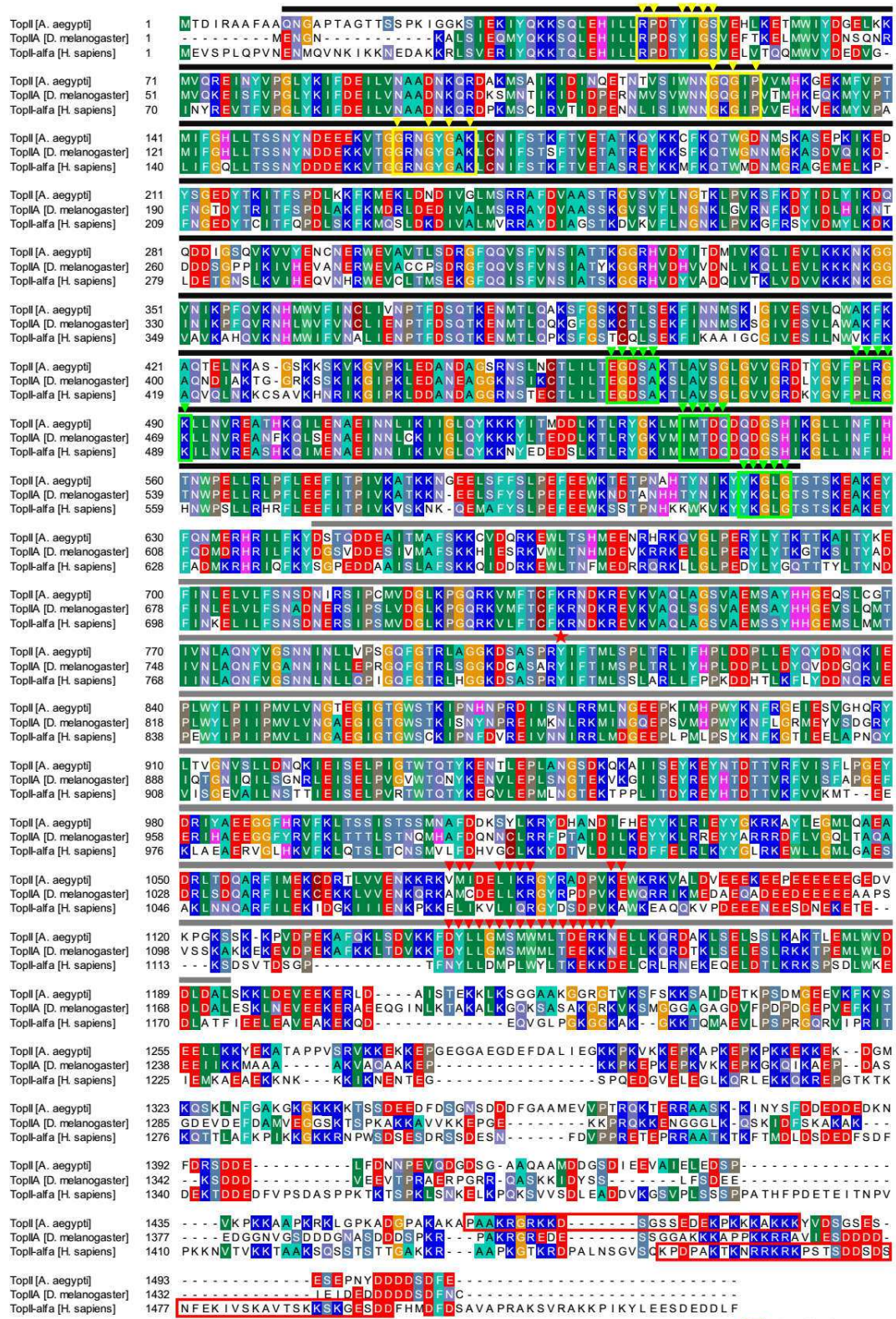
enzima de *Ae. aegypti* exibe um forte candidato de sinal de localização nuclear (NLS) bipartido entre as posições 1460 e 1485, com score geral de 9,4.

Com relação à conservação da estrutura primária, a proteína de *Ae. aegypti* compartilha 64% de identidade e 76% de similaridade com seu ortólogo de *D. melanogaster* e 52% de identidade e 66% de similaridade com a sequência enzima DNA topoisomerase II- $\alpha$  humana.

#### 4.1.2 Reconstrução filogenética

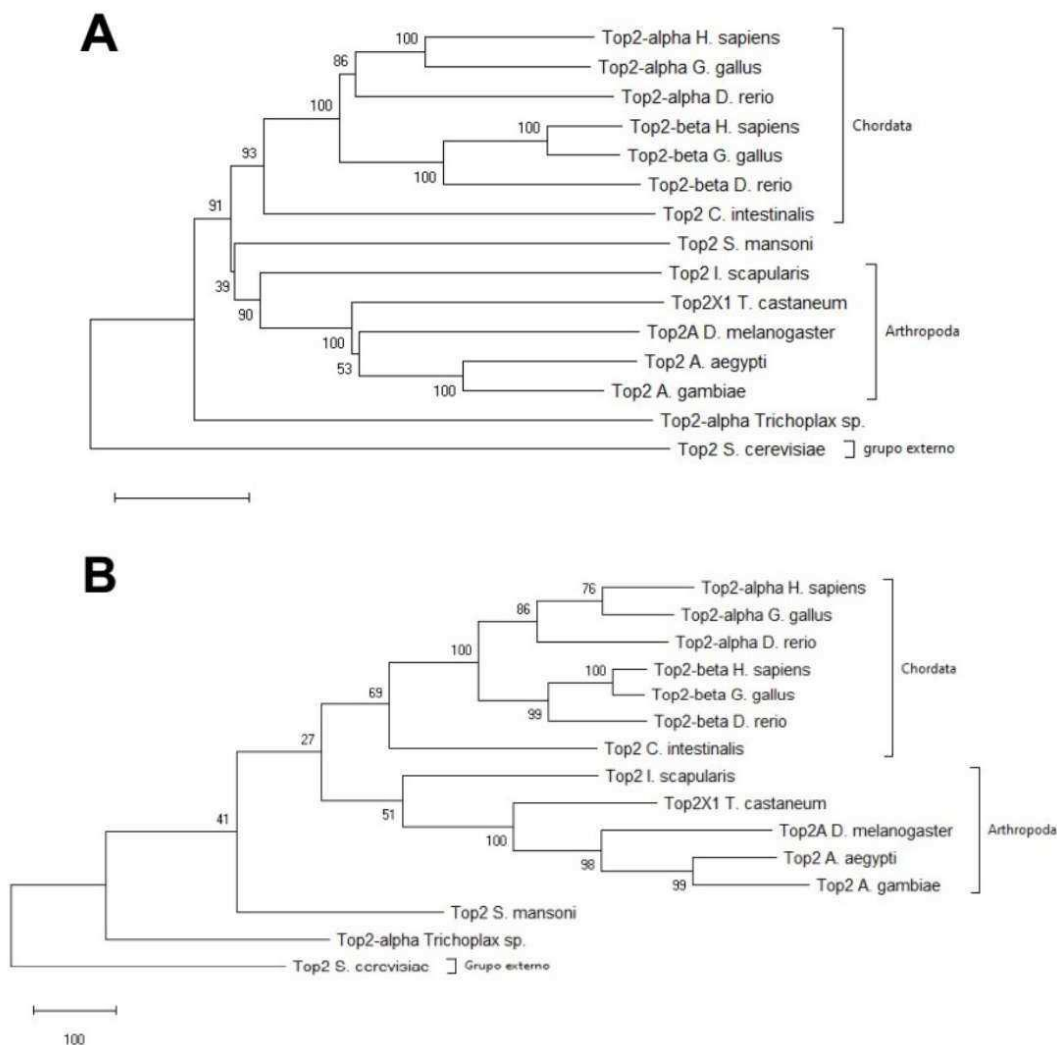
Um alinhamento múltiplo com sequências de enzimas DNA topoisomerasas II de 14 organismos representativos dos diferentes grupos de animais foi feito com o objetivo de obter uma filogenia molecular que representasse o cenário evolutivo das DNA topoisomerasas II nos metazoários. Para a reconstrução filogenética foram utilizados, de forma independente, dois métodos tradicionais e amplamente empregados de análise: o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ – agrupamento de vizinhos; figura 13 A), que emprega uma matriz de distâncias para reconstruir as relações evolutivas entre as sequências, e o método de máxima parcimônia (MP; figura 13 B), baseado em uma matriz de caracteres filogenéticos que infere a filogenia ótima (mais parcimoniosa) para um conjunto de táxons observados.

Nas duas análises observamos que as DNA topoisomerasas do tipo II dos artrópodes divergem em um clado distinto do das enzimas de cordados. Podemos notar também que as isoformas alfa e beta surgem apenas nos vertebrados, não estando presentes ainda nos urocordados. Já o ortólogo dessa enzima no metazoário basal *Trichoplax* sp. surge na base da árvore, em acordo com o padrão evolutivo seguido pelos metazoários. Em ambas as reconstruções filogenéticas, a enzima de *Ae. aegypti* surge agrupada e muito próxima do ortólogo do mosquito *Anopheles gambiae*, confirmando também que o gene estudado no presente trabalho codifica a enzima DNA topoisomerase II em *Ae. aegypti*.





**Figura 12. Alinhamento múltiplo das sequências peptídicas previstas de três enzimas DNA Topoisomerase II de animais.** O alinhamento foi feito utilizando as sequências das enzimas de *Ae. aegypti* (XP001656142), de *D. melanogaster* (NP476760) e da isoforma alfa de *H. sapiens* (NP001058). Na imagem a barra preta representa a parte da sequência que compõe o domínio DNA girase B (GyrB) na proteína, enquanto a barra cinza representa a parte da sequência que compõe o domínio DNA girase A (GyrA). As regiões indicadas pelos retângulos em vermelho representam o sinal de sinalização nuclear (NSL) bipartido previsto para a proteína de *Ae. aegypti*, (conforme programa *cNLSMapper*) e o NLS bipartido da proteína humana (MIRSKI; GERLACH; COLE, 1999). O alinhamento foi realizado pelo programa *ClustalX* (v. 2.0) e editado usando o programa *BioEdit* (v. 7.0.5.3).



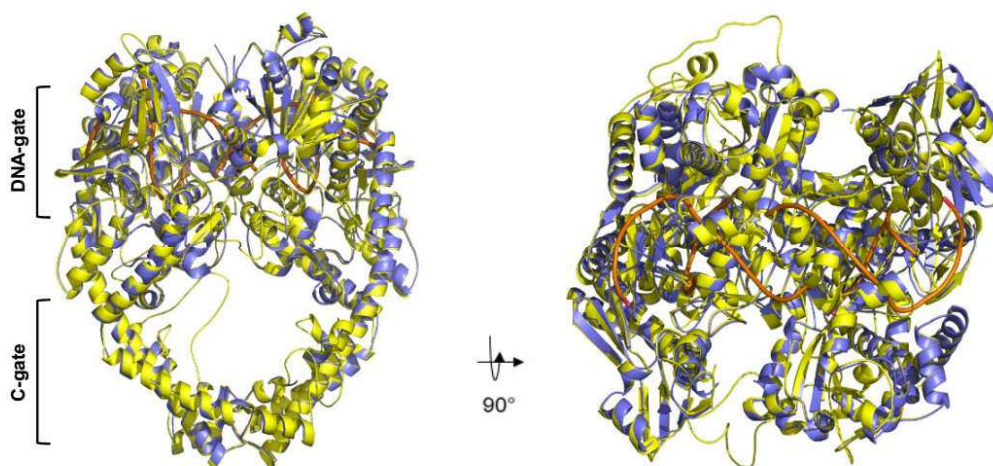
**Figura 13. Reconstruções filogenéticas propostas para enzima DNA topoisomerase II de 14 metazoários.** Em A temos a reconstrução filogenética pelo método de distâncias Neighbor-Joining (NJ) e em B pelo método de máxima parcimônia (MP). Em ambas as análises a validação estatística foi obtida pelo método de bootstrap com 1000 repetições. A sequência primária da DNA Topoisomerase II da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como grupo externo (*outgroup*) nas duas análises e permitiu que as árvores fossem enraizadas. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa *ClustalX* (v. 2.0) e as reconstruções filogenéticas foram feitas empregando o programa *MEGA* (v. 10.0.5). As sequências peptídicas usadas no alinhamento foram obtidas no banco de dados do NCBI, com os respectivos códigos

de acesso: Top2 $\alpha$  *Homo sapiens*: NP001058; Top2 $\beta$  *Homo sapiens*: NP001317629; Top2 $\alpha$  *Gallus gallus*: NP990122; Top2 $\beta$  *Gallus gallus*: NP990413; Top2 $\alpha$  *Danio rerio*: NP001296944; Top2 $\beta$  *Danio rerio*: NP\_001038656; Top2 *Ciona intestinalis*: NP001041456; Top2 *Ixodes scapularis*: XP002399322; Top2X1 *Tribolium castaneum*: XP015833850; Top2A *Drosophila melanogaster*: NP476760; Top2 *Ae. aegypti*: XP001656142; Top2 *Anopheles gambiae*: XP319665; Top2 *Schistosoma mansoni*: XP018654920; Top2 *Trichoplax* sp.: RDD37109; Top2 *S. cerevisiae*: NP014311.

## 4.2 Modelagem comparativa da enzima AeTop2

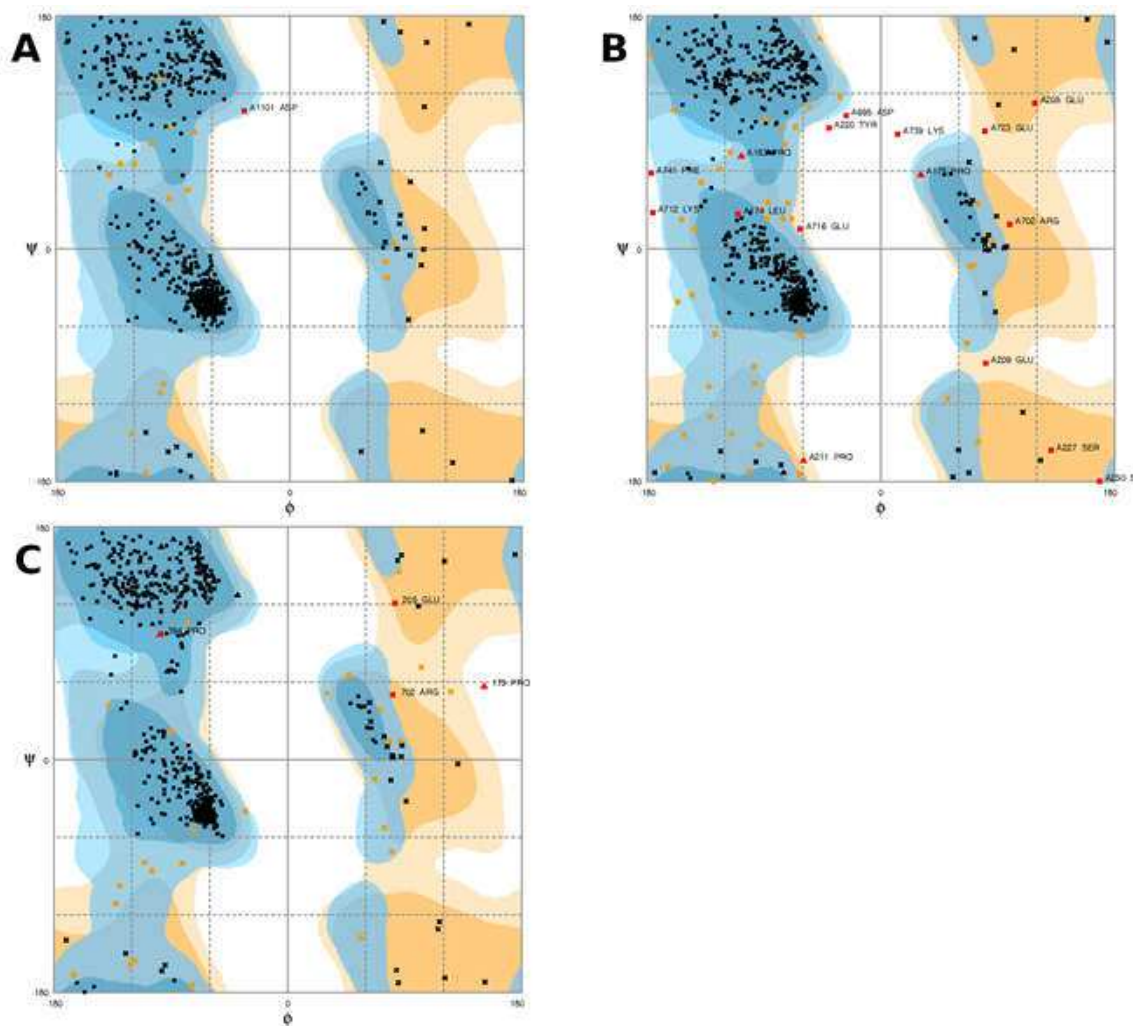
### 4.2.1 Contrução, otimização e validação do modelo da enzima AeTop2

Com a finalidade de investigar as semelhanças e diferenças estruturais entre as enzimas DNA topoisomerase II humana e de *Ae. aegypti* realizamos a modelagem comparativa, de forma a obter um modelo em 3D da enzima de *Aedes aegypti*. O modelo comparativo da enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* apresentam diferenças quanto a disposição das hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ , 53 hélices- $\alpha$  e 44 folhas- $\beta$  no inseto, enquanto a enzima humana apresenta 48 hélices- $\alpha$  e 43 folhas- $\beta$ . O valor do desvio da raiz média quadrática (RMSD), obtido a partir da sobreposição das estruturas molde e modelo, foi de 0,104 Å, com 8.188 átomos envolvidos ao longo da sobreposição, o que aponta uma semelhança estrutural bastante significativa entre molde e modelo (figura 14).



**Figura 14. Sobreposição da estrutura do molde 3QX3 e do modelo AeTop2 construído por modelagem comparativa.** Em azul a estrutura do molde e em amarelo a estrutura do modelo. A trajetória do esqueleto ribose-fosfato do DNA associado está em laranja. O modelo à direita apresenta uma rotação de 90° da enzima, no sentido do observador.

Com o objetivo de avaliar a qualidade estereoquímica do modelo obtido, foi construído o gráfico de Ramachandran comparando molde e modelo, empregando o servidor *Rampage* (figura 15). Como a enzima humana funciona como um homodímero, a análise foi realizada considerando as duas cadeias (A e B) que formam a enzima completa. De acordo com o gráfico, o molde apresentou 97,4% e 97,3% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis, 2,4% e 2,6% em regiões permitidas e 0,2% e 0,2% em regiões tidas como não permitidas para as cadeias A e B, respectivamente. O modelo apresentou 92,0% e 93,6% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis, 5,9% e 4,6% em regiões permitidas e 2,1% e 1,8% em regiões não permitidas para as cadeias A e B, respectivamente (Figura 15 e tabela 4). Para fins de comparação, considera-se como ideal que uma estrutura proteica apresente mais de 90% de seus resíduos de aminoácidos nas regiões favoráveis e nenhum nas regiões muito desfavoráveis ou não permitidas (LASKOWSKI et al., 1993).



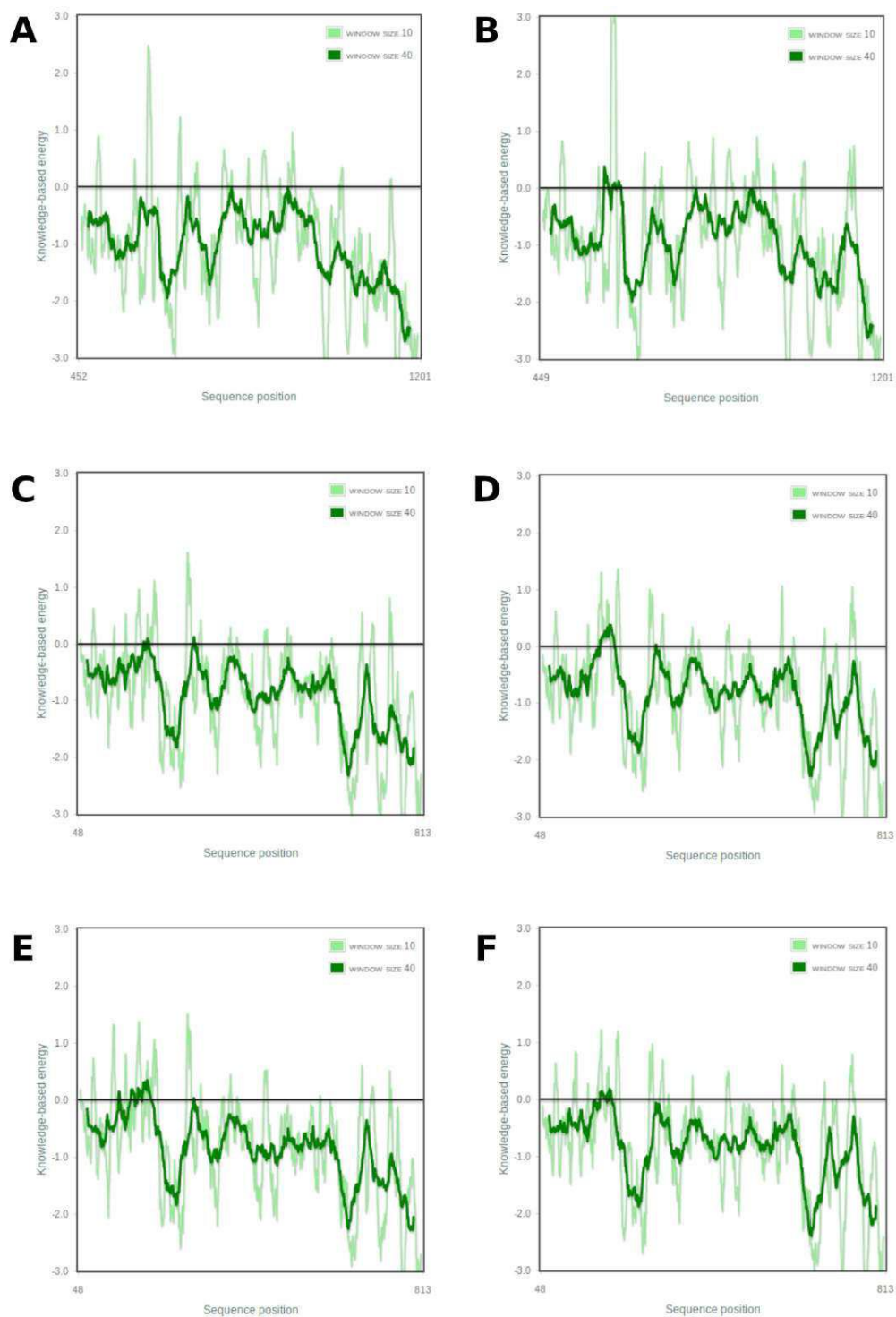
**Figura 15. Representação do gráfico de Ramachandran:** O molde 3QX3 utilizado para construção do modelo (A), o modelo inicial da enzima AeTop2 (B) e do modelo após refinamento no *ModRefiner* (C). Regiões favoráveis e permitidas para aminoácidos em geral são apresentadas em azul escuro e claro, respectivamente. Regiões favoráveis e permitidas especificamente para resíduos de glicina são apresentadas em laranja escuro e claro, respectivamente. As áreas em branco representam as regiões não permitidas.

Para aprimorar as características geométricas do modelo, foram realizadas etapas de refinamento da estrutura, empregando o servidor *ModRefiner*, que gera melhoria nas estruturas locais e na qualidade geral do modelo, por meio de um algoritmo. Após três etapas de refinamento, o modelo foi novamente avaliado pelo gráfico de Ramachandran (figura 15- C). Com as otimizações, o modelo da enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* passou a apresentar 96,1% e 95,7 dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis, 3,4% e 3,8% em regiões permitidas e 0,5% e 0,5% em regiões tidas como não permitidas para as cadeias A e B, respectivamente (quadro 4).

**Quadro 4.** Validação do modelo construído e refinado por modelagem comparativa.

Distribuição dos resíduos	Molde <i>HsTop2-<math>\beta</math></i> (PDB: 3QX3)	Modelo inicial <i>AeTop2 Swiss-Prot</i>	Modelo refinado <i>AeTop2 ModRefiner</i>
Resíduos em regiões favorecidas	A: 646 (97,4%) B: 643 (97,3%)	A: 703 (92,0%) B: 715 (93,6%)	A: 734 (96,1%) B: 731 (95,7%)
Resíduos em regiões permitidas	A: 16 (2,4%) B: 17 (2,6%)	A: 45 (5,9%) B: 35 (4,6%)	A: 26 (3,4%) B: 29 (3,8%)
Resíduos em regiões desfavoráveis	A: 1 (0,2%) B: 1 (0,2%)	A: 16 (2,1%) B: 14 (1,8%)	A: 4 (0,5%) B: 4 (0,5%)

O valor do RMSD para o modelo após a otimização de sua geometria foi de 0,575 Å, com 8.188 átomos envolvidos ao longo da sobreposição. Tais valores são compatíveis com os observados para o molde (PDB: 3QX3), confirmando a qualidade do modelo construído. Ainda com o objetivo de validar a estrutura do modelo refinado, foi utilizado o servidor *ProSA-Web* (figura 16) e calculados os valores de *z-score* (quadro 5 e figura 17), que fornecem uma estimativa da qualidade do modelo construído frente a estruturas já resolvidas experimentalmente. A análise de energia potencial feita pelo programa *ProSA-Web* gera um gráfico que reflete a qualidade local do modelo ao apresentar a energia associada à cadeia em função da posição dos resíduos de aminoácidos ao longo da sequência peptídica. Em geral os valores positivos (acima de zero) correspondem a porções do modelo que apresentam algum problema geométrico. Na figura 16 podemos observar que, de forma semelhante ao molde, o modelo refinado da enzima *AeTop2* apresenta poucas regiões com energia acima de zero, indicando mais uma vez que o modelo da enzima *AeTop2* pode ser considerado satisfatório.



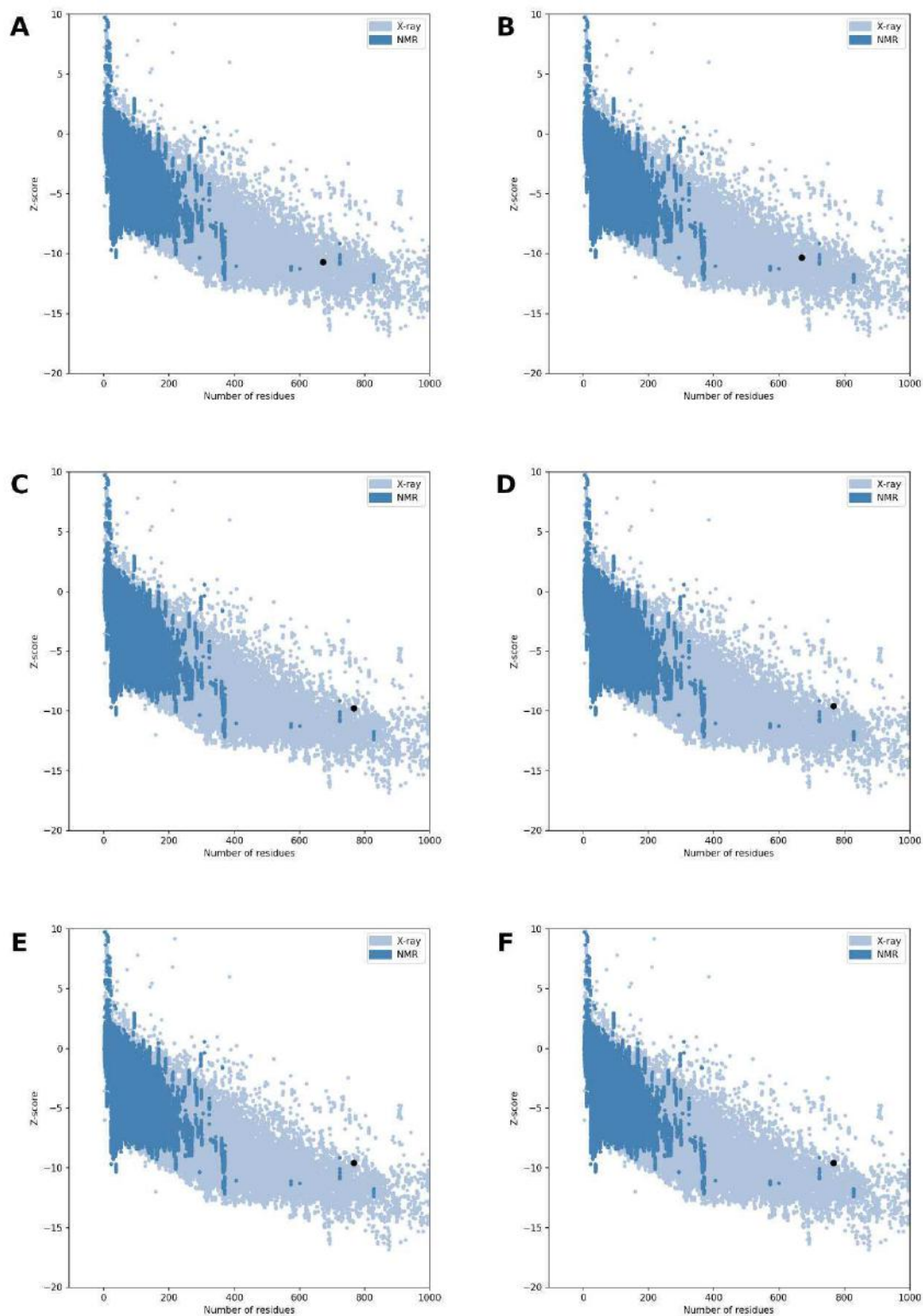
**Figura 16. Análise da energia potencial do molde 3QX3 e dos modelos de AeTop2.** A qualidade local para o molde (3QX3) (A e B), para o modelo construído no servidor *Swiss-Model* (C e D) e para o modelo refinado no servidor *ModRefiner* (E e F). A análise foi feita separadamente para as cadeias A (A, C e E) e B (B, D e F). Em verde claro os valores dos cálculos para janelas de 10 resíduos de aminoácidos e em verde escuro os valores para janelas de 40 resíduos. Análise realizada no servidor *ProSA-Web*.

O *z-score* é um parâmetro que relaciona a energia da estrutura de interesse com a energia de todas as proteínas conhecidas cujas estruturas tenham sido elucidadas por cristalografia de raios-X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Portanto, o cálculo do valor de *Z-score* é um bom indicativo da qualidade do modelo construído frente a estruturas já resolvidas experimentalmente. No quadro 5 podemos observar que os valores de *z-score* para o molde 3QX3 foram de -10,70 e -10,35 para as cadeias A e B, respectivamente. Já o modelo refinado apresentou valores de -9,60 e -9,61 para as cadeias A e B, respectivamente. Esses valores próximos indicam a boa qualidade estrutural do modelo, uma vez que o modelo refinado se mostra consideravelmente semelhante ao molde. Finalmente, nos gráficos da figura 17, vemos que os valores de *z-score* para as cadeias A e B do modelo refinado estão compatíveis com os valores encontrados para proteínas com tamanhos semelhantes e que tiveram suas estruturas elucidadas experimentalmente.

**Quadro 5.** Valores de *Z-score*, obtidos no servidor ProSA-Web.

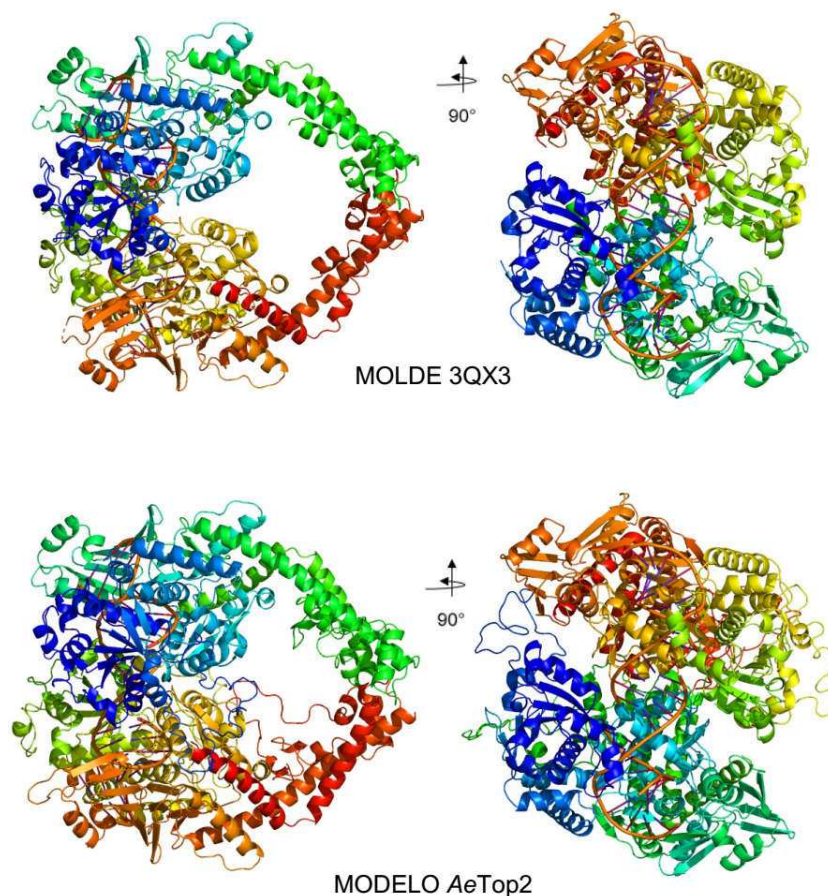
<b>Z-score</b>	<b>Cadeia A</b>	<b>Cadeia B</b>
<b>Molde - HsTop2-β (3QX3)</b>	-10,70	-10,35
<b>Modelo - AeTop2</b>	-9,77	-9,59
<b>Modelo refinado - AeTop2</b>	-9,60	-9,61

Na figura 18 temos as estruturas do molde 3QX3 e do modelo refinado e validado. Podemos perceber claramente que há uma grande semelhança estrutural entre eles, embora algumas diferenças localizadas possam ser observadas, em especial em regiões que supostamente formariam alças. Todavia não podemos considerar essas regiões como diferenças reais encontradas na estrutura do modelo refinado, uma vez que as alças observadas foram obtidas de regiões mais desordenadas e/ou flexíveis e, portanto, não estão definidas na estrutura cristalográfica do molde 3QX3 no PDB.



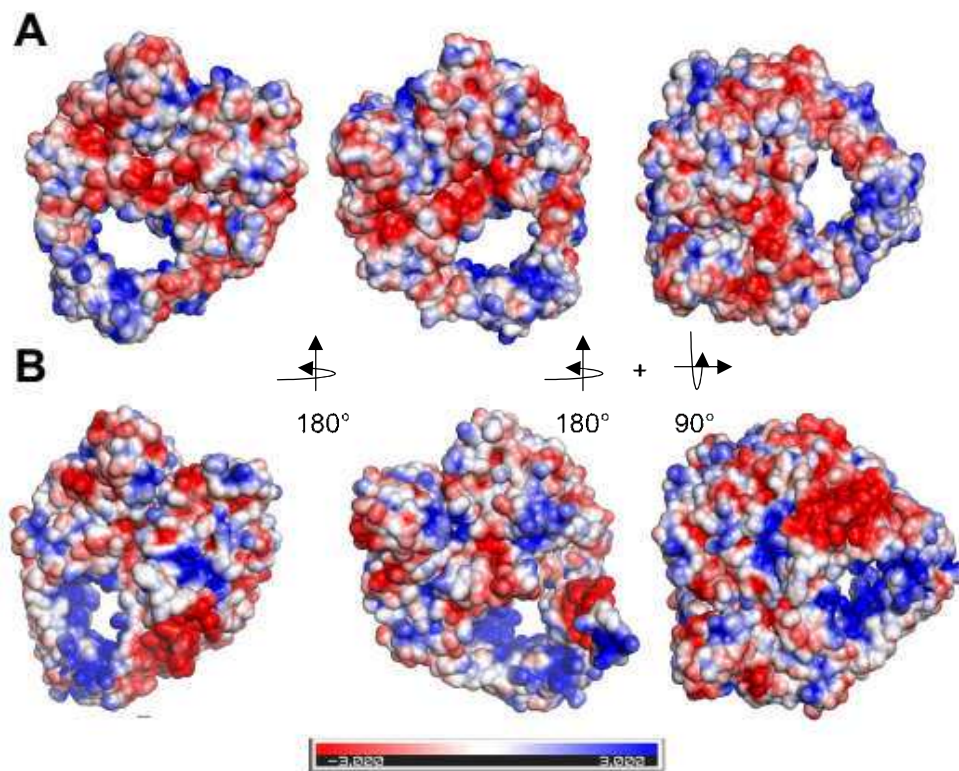
**Figura 17. Análise dos valores de Z-score para o molde (3QX3) e modelo construído:** Para o molde (3QX3) (A e B), para o modelo construído no servidor *Swiss-Model* (C e D) e para o modelo refinado no servidor *ModRefiner* (E e F). A análise foi feita separadamente para as cadeias A (A, C e D) e B (B, D e F). Análises obtidas no servidor *ProSA-Web*.





**Figura 18. Estrutura tridimensional do molde *HsTop2- $\beta$*  - 3QX3 e do modelo *AeTop2*.** Representação dos elementos de estrutura secundária das proteínas (hélices- $\alpha$ , folha- $\beta$  e alças estruturais). Painel superior (molde- 3QX3) e painel inferior (modelo *AeTop2*). A trajetória do esqueleto ribose-fosfato do DNA associado está em laranja. Os modelos à direita apresentam uma rotação de 90° das enzimas, no sentido do observador.

Ainda buscando entender melhor as diferenças químicas e estruturais entre a enzima humana e de *Ae. aegypti*, foram construídos mapas de potencial eletrostático com o programa *PyMOL* (v.2.4.0a0). O molde e os modelos apresentam, até certo ponto, perfis de distribuição de cargas semelhantes (figura 19). A diferença mais evidente na distribuição de cargas pode ser notada na região que conecta o DNA-*gate* com o C-*gate*. Podemos notar que a proteína humana concentra uma grande quantidade de cargas negativas nessa região em ambas as suas faces, o que não ocorre com a proteína de *Ae. aegypti*. Já a conformação diferente, que parece restringir consideravelmente o tamanho da cavidade observada no modelo (em C-*gate*), se deve às regiões de alças, que não estão definidas no molde, conforme mencionado anteriormente.



**Figura 19. Representação do mapa de potencial eletrostático do molde 3QX3 e do modelo refinado AeTop2.** (A) molde e (B) modelo. As regiões com carga negativa são representadas em vermelho, as com carga positiva em azul e as neutras em branco. As imagens estão dispostas com rotação de 180° na vertical, seguida da rotação de 90° na horizontal. Análise realizada com o programa *PyMOL* (v.2.4.0a0).

## 4.2.2 Estudos de *docking* molecular com o inibidor etoposídeo

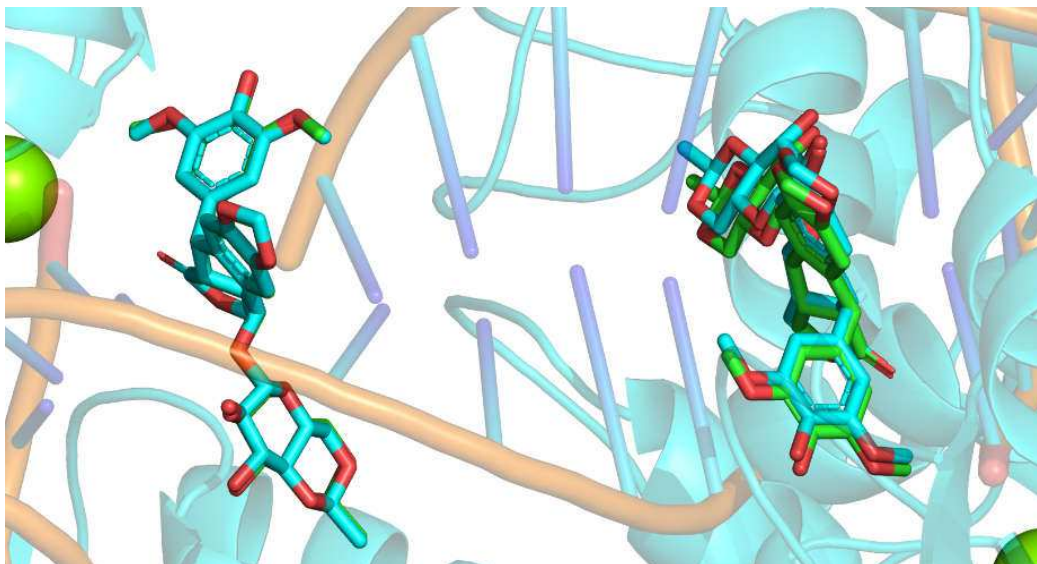
### 4.2.2.1 Validação por *redocking*

Uma vez tendo o modelo da enzima AeTop2 construído, refinado e validado, realizamos um estudo por *docking* molecular das interações do inibidor etoposídeo (VP-16-213) com o modelo, de forma a identificarmos semelhanças e diferenças entre as interações intermoleculares que acontecem entre esse inibidor e as enzimas humana e de *Ae. aegypti*.

Antes de iniciarmos os estudos de *docking* molecular do inibidor etoposídeo com o modelo validado da enzima AeTop2, realizamos um procedimento de *redocking*, que está entre os métodos de validação de *docking* molecular mais utilizados (RODRIGUES et al.,

2012). Esse procedimento consiste em extrair o ligante (no caso, o inibidor etoposídeo) de sua estrutura cristalográfica (no caso, o molde 3QX3) e então reposicionar o ligante em sua estrutura, utilizando a metodologia do *docking*. A eficiência preditiva do procedimento de *docking* pode ser estimada pela comparação entre o posicionamento do ligante na estrutura cristalográfica original e as interações do *docking*. Neste método são analisadas as poses dos ligantes geradas pelos programas de *docking*, que são as conformações geradas em um sítio da proteína alvo com um composto de estrutura conhecida. Desta forma, calcula-se o RMSD da melhor solução fornecida pelo programa de *docking* com a estrutura do ligante co-cristalizado, considerando como critérios para definição da melhor pose os menores valores de RMSD, que representam a capacidade da função de *score* e dos parâmetros de referência utilizados para encontrar as conformações mais próximas às obtidas experimentalmente. Nesse processo, valores de RMSD abaixo de 2,0 Å são considerados satisfatórios (RODRIGUES et al., 2012).

Durante o procedimento de *redocking* foram obtidas um total de 10 conformações de interações do etoposídeo com a enzima humana. A conformação que mais se aproximou da posição original do etoposídeo na estrutura cristalográfica da DNA topoisomerase II humana foi também a que apresentou maior *score*, com valores de 136,7 e 125,71 para as cadeias A e B, respectivamente (figura 20).



**Figura 20. Redocking do etoposídeo na estrutura resolvida da enzima DNA topoisomerase II- $\beta$  humana.** Sobreposição das melhores soluções de *poses* obtidas pelo *redocking* (verde) com a estrutura original obtida por cristalografia (azul claro). Os valores de RMSD para as cadeias A e B foram de 0,6 Å e 0,5 Å, respectivamente. O *redocking* foi realizado como programa GOLD (v. 5.7.0) e visualizado com o programa PyMOL (v.2.4.0a0).

No estudo de *redocking*, foram obtidos valores de RMSD de 0,63 Å e 0,55 Å para as cadeias A e B, respectivamente (quadro 6), quando utilizada a função *ChemPLP*, indicando posição no *docking* muito próxima da apresentada pela estrutura de referência, o ligante co-cristalizado. Por outro lado, a função *ChemScore* não foi capaz de reproduzir uma conformação próxima ao dado cristalográfico. As funções *GoldScore* e *ChemPLP* falharam ao descrever a conformação correta quando o tamanho do raio do sítio de ligação foi definido para 10 Å em torno do átomo central de referência. Portanto, pode-se concluir que a função *ChemPLP* e o raio de 20 Å em torno do átomo de referência podem ser considerados como parâmetros adequados para os estudos de *docking* entre o etoposídeo e o modelo da enzima *AeTop2*.

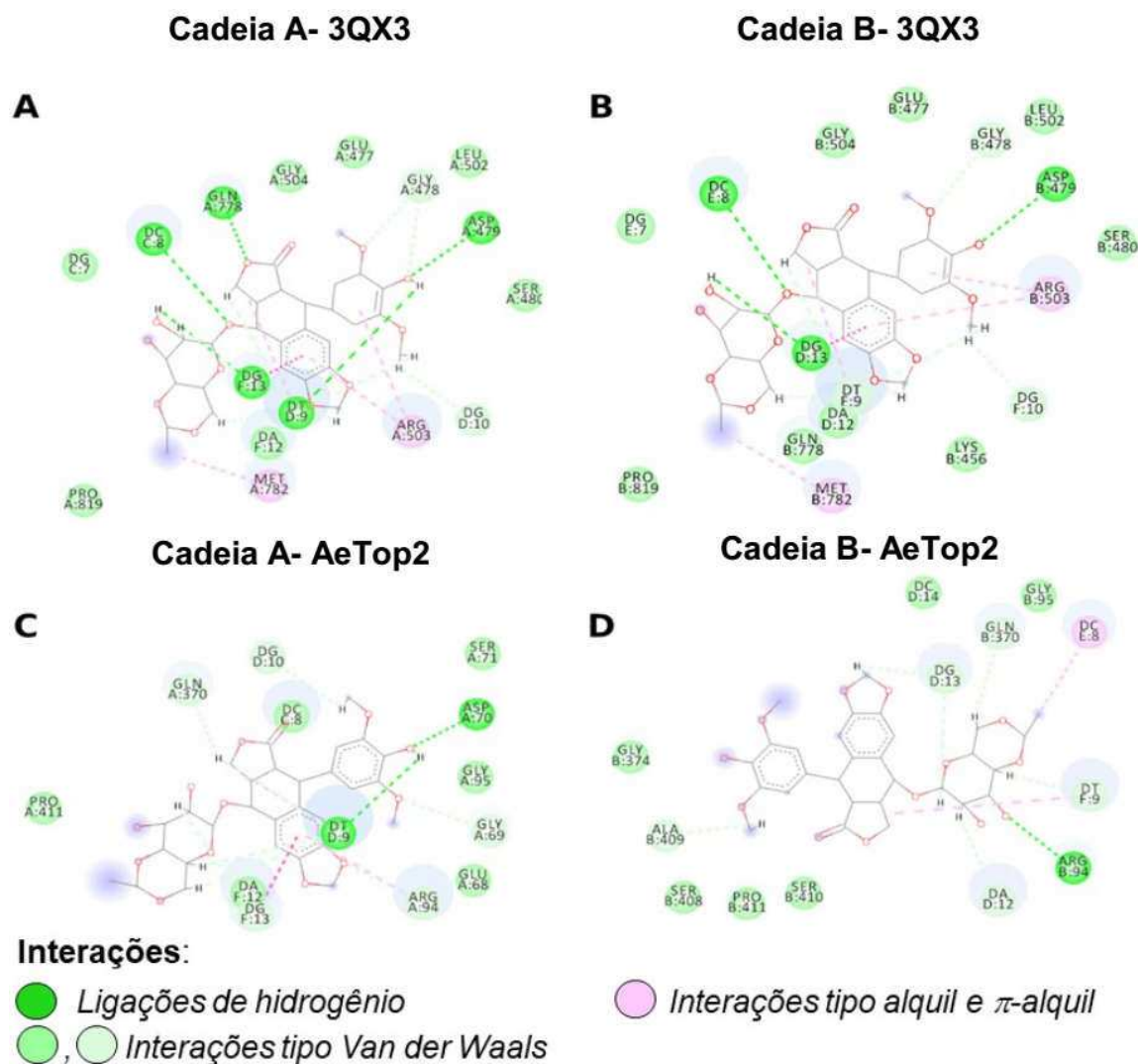
**Quadro 6.** Valores de RMSD em dois volumes de sítio de ligação para a interação do inibidor etoposídeo com a enzima DNA topoisomerase II- $\beta$  humana, no procedimento de *redocking*.

Cadeia	Funções	Raio (Å)	RMSD (Å)
Arg503 Cadeia A	<i>ChemPLP</i>	20	0,63
		10	> 10,00
	<i>ChemScore</i>	20	> 10,00
		10	> 10,00
	<i>GoldScore</i>	20	0,44
		10	9,16
Arg503 Cadeia B	<i>ChemPLP</i>	20	0,55
		10	9,08
	<i>ChemScore</i>	20	> 10,00
		10	> 10,00
	<i>GoldScore</i>	20	0,56
		10	> 10,00

#### 4.2.2.2 *Docking* molecular com a DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*

Após estabelecer os parâmetros do *docking* por meio do *redocking* molecular, foi realizado o *docking* molecular do inibidor etoposídeo com o modelo construído da enzima

AeTop2, com o objetivo principal de identificar as interações do inibidor com a enzima do mosquito e comparar com as interações com a enzima humana. A melhor interação prevista por *docking* do etoposídeo com o modelo da enzima de *Ae. aegypti* apresentou valores de *Score* de 95,61 e 60,70 para as cadeias A e B, respectivamente, e está ilustrada na figura 21. O inibidor se liga à enzima por meio de interações do tipo ligações de hidrogênio, Van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  e  $\pi$ -alquil com resíduos de aminoácidos e bases nitrogenadas do segmento de DNA associado (figura 21). Quanto à posição na estrutura primária, a maior parte dos resíduos que interagem com o etoposídeo no *docking* está localizada nos motivos TOPRIM, no domínio GyrB, ou na região imediatamente adjacente ao resíduo catalítico de tirosina, no domínio GyrA (quadro 7).



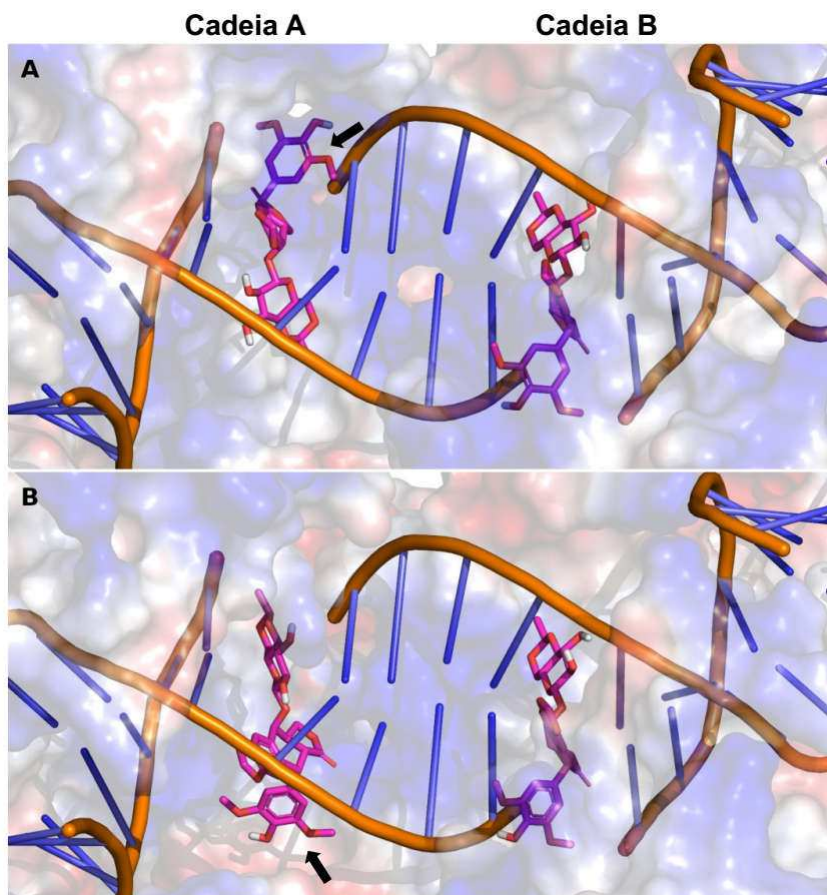
**Figura 21. Representação bidimensional (2D) das interações moleculares obtidas por *docking*.** A e B representam, respectivamente, as interações envolvendo as cadeias A e B da enzima humana, enquanto C e D representam, respectivamente, as interações envolvendo as cadeias A e B da enzima de *Ae. aegypti*, para o *docking* com maior valor de *score*. As siglas DG, DC, DA e DT são referentes às interações do etoposídeo com as bases nitrogenadas do DNA: DG (guanina), DC (citosina), DA (adenina) e DT (timina). O *docking* foi realizado com o programa GOLD (v. 5.7.0) e as interações foram visualizadas com o programa BIOVIA Discovery Studio(v.16.1.0.15350).

Nas representações a seguir temos o *docking* molecular do etoposídeo observado com a distribuição do potencial eletrostático no sítio de interação ao fundo (figura 22) e na ausência da superfície de carga, mostrando os principais resíduos envolvidos nas interações (figura 22 e 23). Nota-se que a melhor pose obtida no *redocking* da proteína molde 3QX3 para cadeia A (figura 22-A) não é atingida na cadeia correspondente do modelo AeTop2, sendo possível observar a estrutura do etoposídeo numa pose oposta ao *docking* da proteína humana (figura 22-B).

**Quadro 7.** Resíduos de aminoácidos que realizam interações com o inibidor etoposídeo.

Tipos de interação	Molde 3QX3 (cadeia)	AeTop2 (cadeia)
Ligação de hidrogênio	Asp479 (A,B); [D484]*  Gln778 (A); [Q783]	Asp70 (A); [D464]*  Arg94 (B); [R488]*
Van der Waals	Lys456 (B); [K461]  Glu477 (A,B); [E482]*  Gly478 (A,B); [G483]*  Ser480 (A,B); [S485]*  Leu502 (A,B); [L507]*    Gly504 (A,B); [G509]*  Gln778 (B); [Q783]    Pro819 (A,B); [P824] <sup>#</sup>	Glu68 (A); [E462]*  Gly69 (A); [G463]*  Ser71 (A); [S465]*    Arg94 (A); [R488]*  Gly95 (A,B); [G489]*  Gln370 (A,B); [Q764]  Gly374 (B); [G768]  Ser408 (B); [S802] <sup>#</sup>  Ala409 (B); [A803] <sup>#</sup>  Ser410 (B); [S804] <sup>#</sup>  Pro411 (A,B); [P805] <sup>#</sup>
$\pi$ -alquil	Arg503 (A,B); [R508]*  Met782 (A,B); [M787]	Arg94 (A); [R488]*

Comparação entre a enzima DNA topoisomerase II humana co-cristalizada com o etoposídeo (3QX3) e o modelo da enzima de *Ae. aegypti* (AeTop2), na pose que apresentou melhor *score* de *docking*. Resíduos em uma mesma linha indicam posições homologas nas duas estruturas. A numeração junto aos resíduos é referente às posições atribuídas nas estruturas tridimensionais. A numeração entre colchetes indica a posição dos resíduos na estrutura primária das proteínas. \* indicam resíduos que integram motivos TOPRIM, enquanto # indicam resíduos na vizinhança da do resíduo catalítico de tirosina.



**Figura 22. Representação do *docking* do etoposídeo na presença da superfície de potencial eletrostático.** Em A, temos a representação da proteína humana (molde 3QX3) e em B o modelo construído (AeTop2). As setas indicam a orientação da pose do etoposídeo na cadeia A do molde e no modelo. Imagem analisada no *PyMOL* (v.2.4.0a0).

Observamos na análise que, apesar da pose “invertida” obtida na cadeia A do modelo, o inibidor ainda sim compartilha parte das interações com resíduos de aminoácidos semelhantes às encontradas para o molde 3QX3 (figura 23-A e B). Adicionalmente, verificamos que a pose “esperada” em relação ao molde na figura 23-C, com *score* de 75,70, é considerada a de menor *score* entre as 10 poses analisadas para cadeia A do modelo AeTop2. Já o *score* da cadeia B se manteve constante entre as melhores poses obtidas, com valores em torno 60,70.



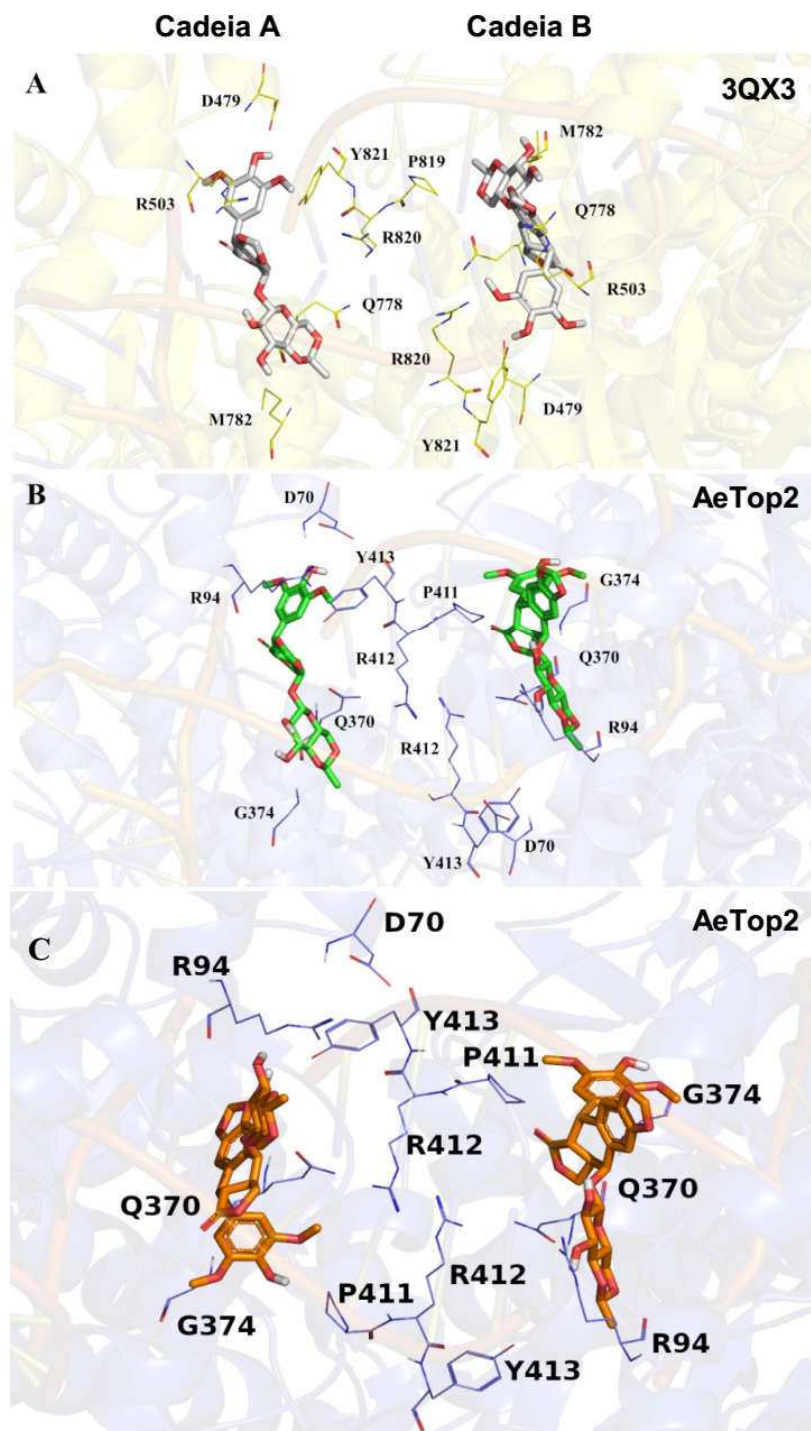


Figura 23. Representação dos resíduos de aminoácidos que interagem no *docking* do etoposídeo nas cadeias A e B enzima DNA topoisomerase II. Em amarelo temos os resíduos de aminoácidos da proteína humana (molde 3QX3); B) em azul temos os resíduos do modelo construído (AeTop2) na pose *docking* obtida com maior valor de *score* na análise. C) em azul temos os resíduos do modelo construído (AeTop2) na pose *docking* obtida com menor valor de *score* na análise. Docking realizado no Gold e a análise da estrutura no PyMOL (v.2.4.0a0).

Por fim, comparamos os resíduos de aminoácidos do molde 3QX3 e do modelo refinado AeTop2 que interagem com o etoposídeo no *docking*, na pose com melhor valor de *score*. O quadro 8 mostra um alinhamento dos resíduos em posições homólogas nas enzimas DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* e isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  humana para uma melhor visualização e compreensão de possíveis substituições nos resíduos que interagem com o inibidor. Tal comparação nos permite fazer possíveis relações quanto a natureza e a importância dos aminoácidos envolvidas na inibição da enzima em questão, possibilitando a busca por alvos moleculares seletivos na proteína do inseto.

**Quadro 8.** Alinhamento dos resíduos em posições homólogas das enzimas AeTop2 e Top2- $\beta$  humana que realizam interações com o inibidor etoposídeo.

<b>AeTop2</b>	K <sub>441</sub>	E <sub>462</sub>	G <sub>463</sub>	D <sub>464</sub>	S <sub>465</sub>	L <sub>487</sub>	R <sub>488</sub>	G <sub>489</sub>	Q <sub>764</sub>	G <sub>768</sub>	S <sub>802</sub>	A <sub>803</sub>	S <sub>804</sub>	P <sub>805</sub>
<b>HsTop2-<math>\beta</math></b>	K <sub>461</sub>	E <sub>482</sub>	G <sub>483</sub>	D <sub>484</sub>	S <sub>485</sub>	L <sub>507</sub>	R <sub>508</sub>	G <sub>509</sub>	Q <sub>783</sub>	M <sub>787</sub>	A <sub>821</sub>	A <sub>822</sub>	S <sub>823</sub>	P <sub>824</sub>
<b>HsTop2-<math>\alpha</math></b>	K <sub>440</sub>	E <sub>461</sub>	G <sub>462</sub>	D <sub>463</sub>	S <sub>464</sub>	L <sub>486</sub>	R <sub>487</sub>	G <sub>488</sub>	M <sub>762</sub>	M <sub>766</sub>	S <sub>800</sub>	A <sub>801</sub>	S <sub>802</sub>	P <sub>803</sub>
<b>DmTop2</b>	K <sub>420</sub>	E <sub>441</sub>	G <sub>442</sub>	D <sub>443</sub>	S <sub>444</sub>	L <sub>466</sub>	R <sub>467</sub>	G <sub>468</sub>	V <sub>742</sub>	M <sub>746</sub>	C <sub>780</sub>	A <sub>781</sub>	S <sub>782</sub>	A <sub>783</sub>
<b>Conservação</b>	*	*	*	*	*	*	*	*				*	*	

Adicionalmente estão representados os resíduos homólogos na DNA topoisomerase 2 de *D. melanogaster* e a isoforma Top2- $\alpha$  humana. Sombreados em salmão estão os resíduos que fazem interações do tipo Van der Waals, em verde escuro os que fazem ligações de hidrogênio, em rosa interações do tipo pi-alquile em amarelo resíduos que fazem interações múltiplas. Os resíduos cuja interação envolve somente uma das cadeias do homodímero (A ou B) estão representados em células com bordas espessas. Os asteriscos indicam resíduos conservados em todas as sequências.

### 4.3 Estudo da expressão gênica da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*

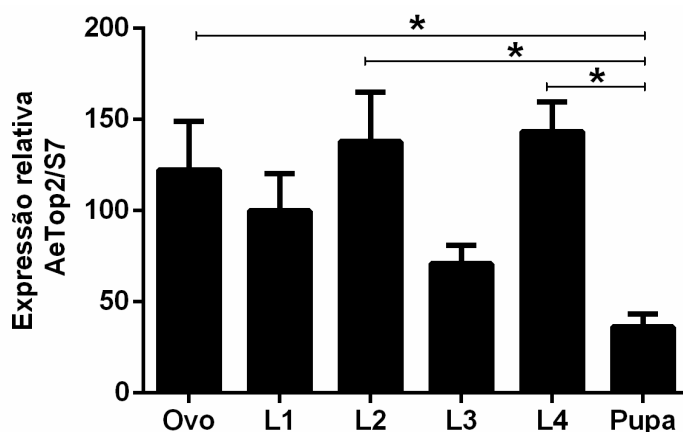
#### 4.3.1 Perfil de expressão gênica do mRNA da enzima AeTop2 ao longo das fases juvenis do ciclo de vida mosquito *Aedes aegypti*

Com o objetivo de investigar a variação da expressão do gene da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* (AeTop2) ao longo das fases do ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti* (ovo, estágios larvais e pupa), realizamos uma análise de expressão relativa por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida por transcrição reversa (RT-qPCR, figura 24). Na análise de quantificação da expressão relativa (usando como referência o gene que codifica a proteína ribossomal S7) foi observada uma maior

expressão para os estágios de ovo, larvas de 2º estágio (L2) e larvas de 4º estágio (L4). O estágio de pupa apresentou a menor quantidade relativa de mRNA para tendo sua expressão reduzida em aproximadamente 3,9 vezes quando comparado ao estágio anterior, as larvas L4.

Dentre os estágios larvais, o 3º estágio apresentou a menor expressão relativa para o mRNA da enzima AeTop2, seguido pelas larvas de 1º estágio. As larvas L3 apresentaram valores de expressão gênica cerca de 2 vezes menores que larvas L2 e L4, sem diferença estatística entre os grupos observados no teste.

Apesar de a representação gráfica sugerir ao menos uma diferença de expressão entre os valores de todas as amostras (ovo e larvas) e o estágio de pupa, a análise estatística não paramétrica não detectou diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 24. Expressão relativa do mRNA da enzima DNA topoisomerase II nos estágios iniciais do ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*.** As amostras de RNA total de ovos, larvas L1 a L4 e pupas foram submetidas a RT-qPCR e analisadas pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), utilizando o mRNA da proteína ribossomal S7 como gene referência. AeTop2: gene alvo. L1: larva de 1º estágio, L2: larva de 2º estágio, L3: larva de 3º estágio, L4: larva de 4º estágio. No eixo Y, de unidades arbitrárias, valor de  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  é multiplicado por  $10^4$  para facilitar as comparações. Os dados foram trabalhados com o programa *GraphPad Prism* (v.6.01), com as colunas representando as médias e as barras o desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA e seguida pelo pós teste de *Tukey* (\*  $p \leq 0,05$ ).

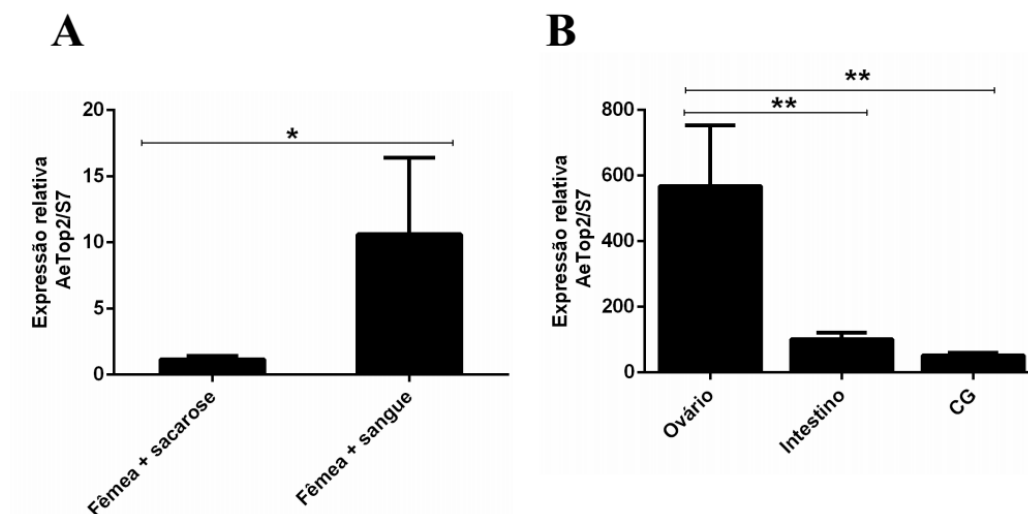
#### 4.3.2 Perfil de expressão gênica do mRNA da enzima AeTop2 em fêmeas e nos órgãos do mosquito *Ae. aegypti*

Após a alimentação com sangue as fêmeas de *Ae. aegypti* passam por um processo acentuado de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e preparação para

ovoposição (LEA; BRIEGEL; LEA, 1978). Com o objetivo de verificar a influência do aporte nutricional sobre o perfil de expressão da enzima AeTop2 em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* fizemos uma comparação entre a quantificação do mRNA dessa enzima em fêmeas alimentadas com 10% de sacarose e fêmeas após 48 horas de ingestão sanguínea (figura 25-A). Observamos uma expressão do mRNA aproximadamente 9,4 vezes maior em fêmeas alimentadas com sangue em relação a fêmeas alimentadas somente com açúcar.

Havendo verificado uma maior expressão do mRNA da DNA topoisomerase II em resposta à alimentação com sangue nas fêmeas adultas de *Ae. aegypti*, decidimos verificar se esse aumento de expressão poderia ser relacionado à uma maior atividade proliferativa associada aos ovários. Na figura 25-B, observamos a variação da expressão do mRNA dessa enzima em três diferentes órgãos de fêmeas (ovário, intestino e corpo gorduroso) após a alimentação com sangue. Nesta análise o ovário foi o órgão que apresentou uma maior expressão do mRNA, enquanto o corpo gorduroso apresentou níveis mais baixos de expressão. Assim, no ovário a expressão do mRNA da AeTop2 foi cerca de 5,6 vezes mais elevada que no intestino e 10,9 vezes maior que no corpo gorduroso.

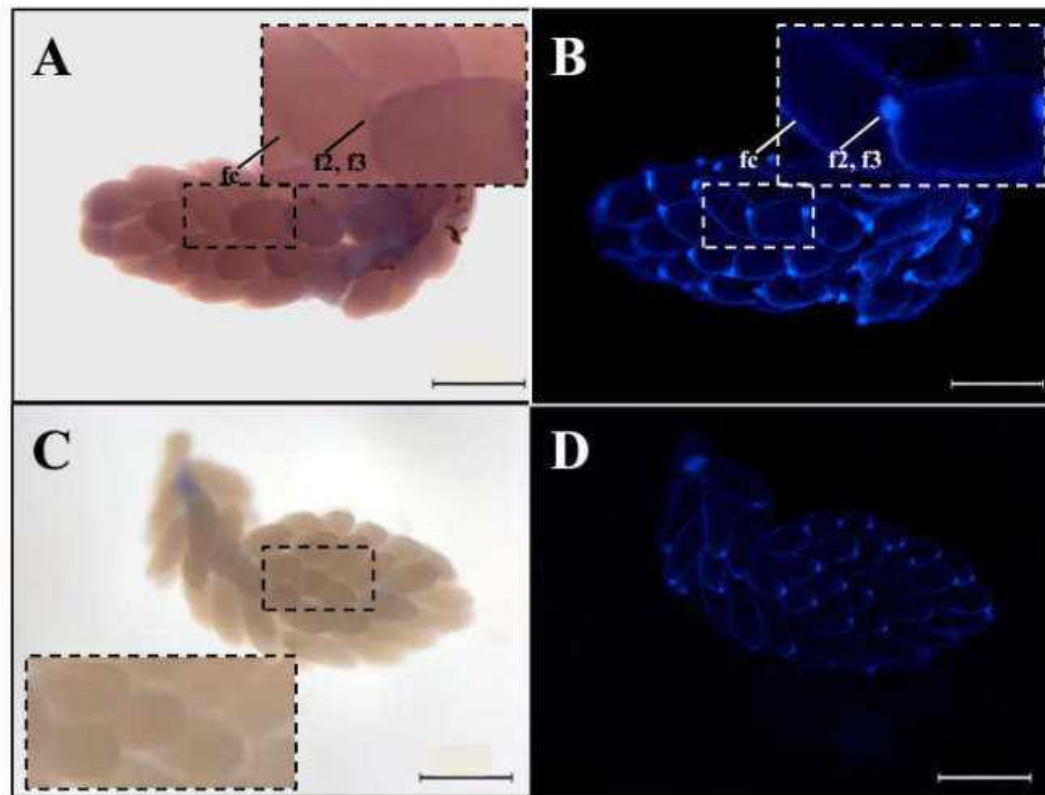
Apesar de a representação gráfica sugerir uma diferença entre os valores de expressão relativa para ovário, intestino e corpo gorduroso, a análise estatística apontou diferenças significativamente apenas entre ovário e corpo gorduroso ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 25. Expressão relativa do mRNA da enzima DNA Topoisomerase II em fêmeas *Ae. aegypti*:** Em A temos a expressão em fêmeas alimentadas com sacarose e após 48 horas do repasto sanguíneo. Em B temos a expressão nos órgãos (ovário, intestino e corpo gorduroso) de fêmeas alimentadas com sangue. A análise por RT-qPCR das amostras (fêmeas: corpo inteiro) referentes ao gráfico A, foi realizada pelo método de comparação da expressão relativa  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde o RNA total de fêmeas alimentadas com sacarose foi utilizado como calibrador na análise. A análise referente ao B foi realizada pelo método de expressão relativa  $2^{-\Delta Cq}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Em ambas as análises os valores são normalizados em relação ao mRNA do gene referência S7. Top2: gene alvo. CG: Corpo gorduroso. Os dados foram trabalhados com o programa *GraphPad Prism* (v.6.01), com as colunas representando as médias e as barras o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística em A foi obtida com *Teste t* ( $p = 0,0476$ ) e em B com o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn's* ( $p \leq 0,05$ ).

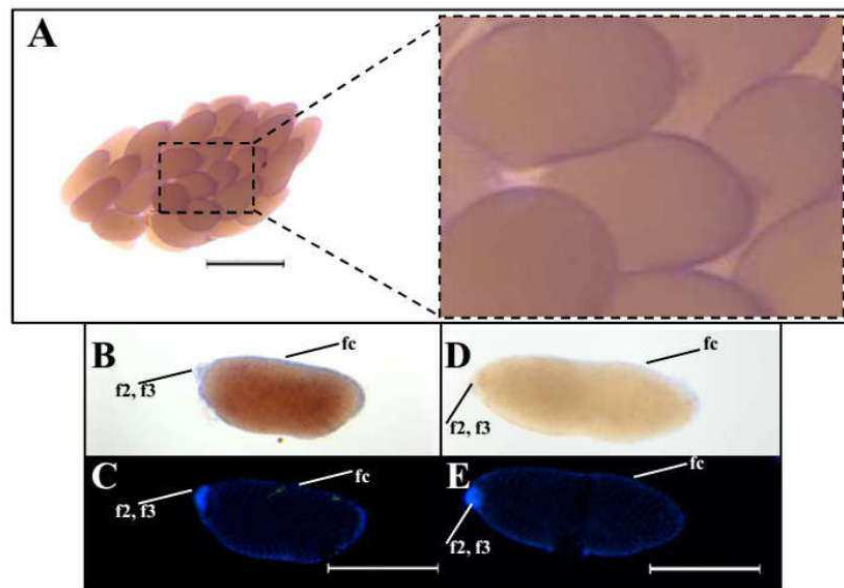
#### 4.3.3 Hibridização *in situ* do mRNA da enzima AeTop2 no ovário de fêmeas de *Ae. aegypti*

Como foi visto no item 4.2.2, o ovário foi o órgão analisado com maior expressão relativa da enzima DNA topoisomerase II. O ovário de mosquitos é um órgão relativamente complexo, possuindo diferentes tipos celulares (ex. nutridoras, foliculares) especializados na produção e maturação dos ovócitos (BASILE, 1969) e, para entendermos melhor a importância dessa enzima para a fisiologia ovariana, realizamos a detecção *in situ* do mRNA da enzima DNA topoisomerase II em ovários dissecados de fêmeas adultas do mosquito *Ae. aegypti*. A sonda antisense para o mRNA da enzima AeTop2 apresentou marcação positiva na cor roxa ao longo das células epiteliais foliculares de todo o ovário (figura 26-A e 27-A). A presença de células nesta região foi confirmada pela fluorescência dos núcleos ao redor de cada ovócito usando DAPI (figura 26-B).



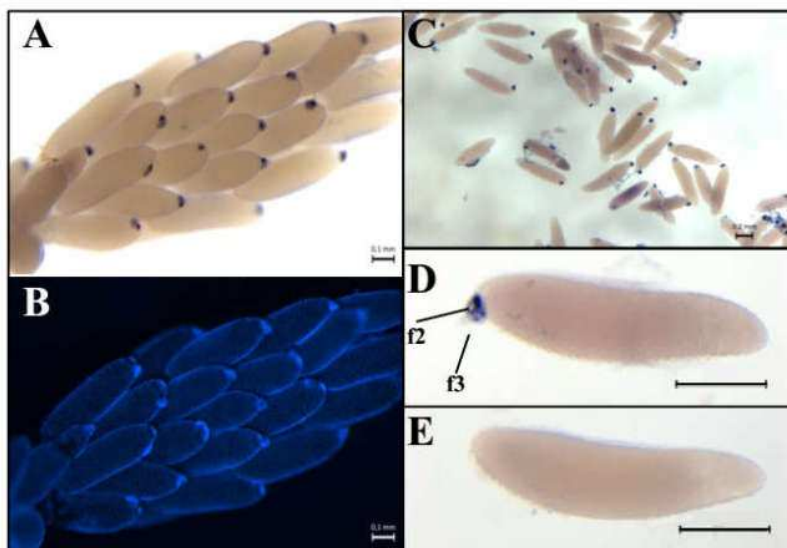
**Figura 26. Hibridização *in situ* do mRNA da enzima *AeTop2* em ovários de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue.** Em A e C: Imagens do campo claro de ovários marcados com a sonda antisense e a sonda senso (controle) para o mRNA da *AeTop2*, respectivamente. As marcações positivas da hibridização *in situ* são demonstrados em roxo no tecido. Em B e D: fluorescência nuclear (marcação com DAPI) dos mesmos campos mostrados no campo claro, respectivamente. Os ovários foram obtidos 36 horas após a alimentação sanguínea. fc: células epiteliais foliculares; f2, f3: folículos secundários e terciários. Barras de escala: 0,5 mm. As imagens foram adquiridas com estereomicroscópio Leica, modelo M205.

Ao observarmos a câmara de ovocítica separadamente em maior aumento (figura 27-B) identificamos nitidamente que a sonda antisense do mRNA do gene da *AeTop2* está localizado nas células foliculares (fc) e na região dos folículos secundários e terciários agrupados (f2 e f3), confirmando o acúmulo do RNA da enzima nestas regiões.



**Figura 27.** Hibridização *in situ* do mRNA da enzima AeTop2 nos folículos ovarianos de fêmeas *Ae. aegypti* alimentadas com sangue. Em B e D: Imagens do campo claro da câmara ovocítica separadamente do ovários, marcadas com a sonda antisense AeTop2 e a sonda controle senso AeTop2, respectivamente. As marcações positivas das hibridizações da sonda antisense estão em roxo no tecido. Em C e E: fluorescência nuclear (marcação com DAPI) dos mesmos campos mostrados no campo claro respectivamente. Os folículos ovarianos foram obtidos de ovários dissecados 36 horas após a alimentação sanguínea. fc: células epiteliais foliculares; f2, f3: folículos secundários e terciários. Barras de escala: 0,5 mm (A) e 0,2 mm. As imagens foram adquiridas com estereomicroscópio Leica, modelo M205.

Adicionalmente, a marcação *in situ* para o mRNA do gene *oskar* foi empregada como controle positivo para os passos da técnica (figura 28-A, B e C), sendo adicionada ao conjunto de dados experimentais para visualizar o perfil de marcação de uma sonda de mRNA com padrão já conhecida não relacionada, descrita na literatura pela marcação pontual nos folículos secundários e terciários (f2 e f3) em ovócitos nos estágios embrionários de *Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti* (JUHNS; JAMES, 2006).



**Figura 28. Hibridização *in situ* do mRNA do gene *oskar* em ovários e folículos ovarianos de *Ae. aegypti*.** Em A: Imagem do campo claro do ovário com a marcação da sonda antisense do mRNA *oskar*. Em B: Fluorescência nuclear (marcação com DAPI) do mesmo campo mostrado no campo claro. Em C: No campo claro temos folículos ovarianos separados marcados com a sonda antisense *oskar*, demonstrando um mesmo padrão de marcação em diferentes folículos (f2 e f3) observados. Em D: Demonstração da câmara ovocítica em maior aumento com marcação da sonda antisense *oskar*. Em E: Demonstração da câmara ovocítica em maior aumento com ausência da marcação da sonda sentido *oskar* controle. As marcações positivas são mostrados em roxo. f2: folículo secundário; f3: folículo terciário. Barras de escala: 0,1 mm (A e B) e 0,2 mm (C, D e E). As imagens foram adquiridas com estereomicroscópio Leica, modelo M205.

#### 4.4 Efeitos do inibidor etoposídeo sobre as larvas de *Ae. aegypti*

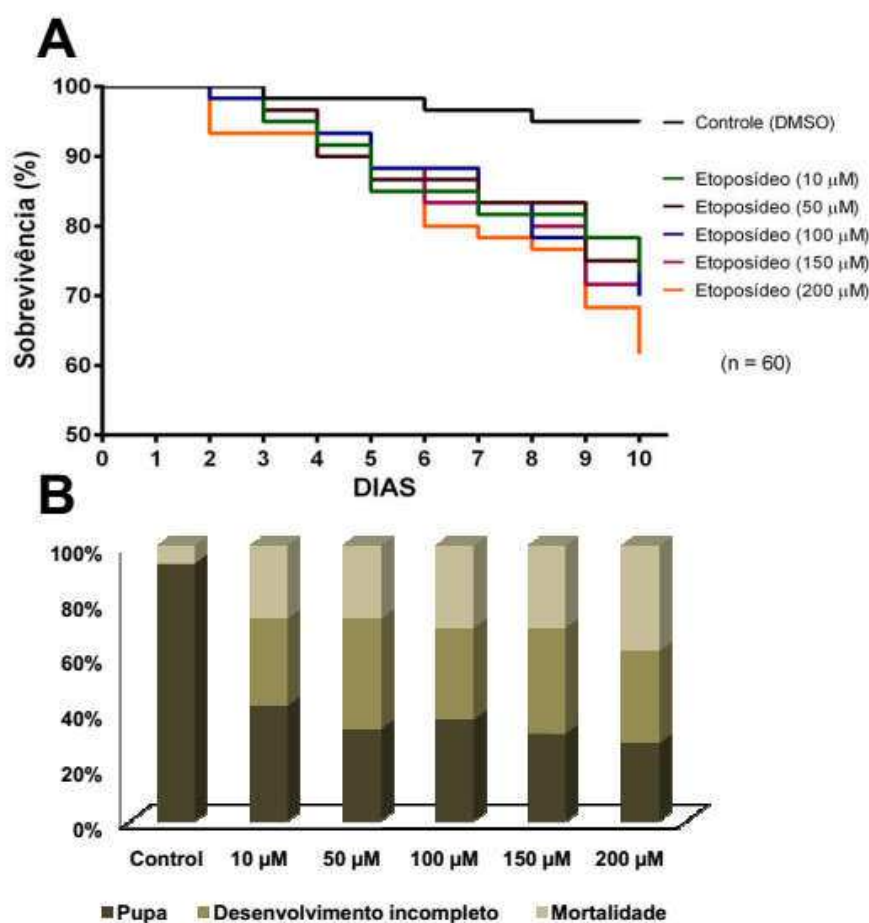
##### 4.4.1 Análise da sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* expostas ao inibidor etoposídeo (VP-16-213): bioensaio de atividade larvicida

Com a finalidade de investigar os efeitos da inibição da DNA topoisomerase II sobre o desenvolvimento do *Ae. aegypti* realizamos um bioensaio de atividade larvicida, onde larvas no estágio L2 foram tratadas com concentrações crescentes do inibidor etoposídeo/VP-16-213 (10, 50, 100, 150 e 200  $\mu$ M) e monitoradas diariamente, ao longo de 10 dias. O gráfico de Kaplan-Meier pode ser utilizado para visualizar a sobrevivência de organismos submetidos a determinados tratamentos em intervalos regulares de tempo (RICH et al., 2010). No bioensaio, os tratamentos com etoposídeo apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle (figura 29-A), mostrando redução da



sobrevivência das larvas, de acordo com o teste não paramétrico de Mantel-Cox (ou teste de *Log-rank*,  $p < 0,0042$ ).

Observamos que a partir do 7º dia houve uma tendência mais acentuada ao aumento na mortalidade das larvas no teste (figura 29-A), com o percentual de sobrevivência de 81,67% para 10  $\mu\text{M}$ , 83,33%, para 50 e 100  $\mu\text{M}$ , 80% para 150  $\mu\text{M}$  e 78,33% para 200  $\mu\text{M}$ , enquanto o controle sem inibidor apresentou sobrevivência de 96%. De uma forma geral, verificamos que, quanto maior a concentração do inibidor etoposídeo, maior a mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*.



**Figura 29. Bioensaio com larvas de *Ae. aegypti* expostas ao etoposídeo.** A: Gráfico de sobrevivência Kaplan-Meier do bioensaio com concentrações crescentes de etoposídeo (inibidor da enzima DNA topoisomerase II). As larvas de controle foram expostas a 0,2% de DMSO. O teste de Log-rank de Mantel-Cox indica diferença significativa entre as curvas ( $p < 0,0042$ ) e o teste de Log-rank para tendência indica efeito de dose significativo entre os tratamentos ( $p < 0,0003$ ). B: Proporção de resultados observados para larvas de *Ae. aegypti* no 10º dia de tratamento com etoposídeo. O ensaio começou com um total de 60

larvas de segundo estágio (L2) para cada tratamento. O controle contendo apenas água foi omitido da representação gráfica por apresentar valores muito próximos ao controle com DMSO.

Na tabela 1, podemos observar que ao final do bioensaio, no 10º dia de exposição ao inibidor etoposídeo, a mortalidade das larvas foi de aproximadamente 27% para as concentrações de 10µM e 50 µM, 30% para as concentrações de 100 µM e 150 µM e 38% para a concentração de 200 µM. De fato, quando os dados da curva de sobrevivência são submetidos ao teste de *Log-rank* para tendências (*Log-rank test for trend*), verifica-se um efeito de dose significativo (com  $p < 0,0003$ ).

**Tabela 1.** Percentual de sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* no 10º dia de bioensaio com etoposídeo (VP-16-213).

Controle (DMSO)	Controle (H <sub>2</sub> O)	Etoposídeo				
		10 µM	50 µM	100 µM	150 µM	200 µM
95%	93,33%	73, 33%	73, 33%	70%	70%	61, 66%

Com o objetivo de avaliar a capacidade das larvas tratadas com as concentrações crescentes de etoposídeo completarem o desenvolvimento até o estágio de pupa, o número total de pupas formadas até o 10º dia de bioensaio foi contabilizado. Observamos uma menor de formação de pupas nos grupos com inibidor, quando comparados com o grupo controle (57 pupas de 60 larvas iniciais). Com o objetivo de avaliar a capacidade das larvas tratadas com as concentrações crescentes de etoposídeo completarem o desenvolvimento até o estágio de pupa, o número total de pupas formadas até o 10º dia de bioensaio foi contabilizado. Observamos uma menor de formação de pupas nos grupos com inibidor, quando comparados com o grupo controle (57 pupas de 60 larvas iniciais, ou seja 95% formaram pupas). Assim foram observadas apenas 25 pupas na concentração de 10 µM, 20 em 50 µM, 22 em 100 µM, 19 em 150 µM e 17 em 200 µM, valores que

representam percentuais de redução na formação de pupas equivalentes a 51.2%, 58%, 56,41%, 61,67% e 65,2%, respectivamente (figura 29- B).

É importante ressaltar que parte das larvas que não sofreram metamorfose para o estágio de pupa permaneceram no estágio de L2, L3 e L4, sendo possível observar os diferentes estágios de desenvolvimento em todas as concentrações do inibidor no bioensaio. Já as larvas do grupo controle iniciam a metamorfose em pupa e mosquitos adultos a partir do 8º dia do bioensaio. Esses dados implicam em um possível atraso no desenvolvimento das larvas de *Ae. aegypti*, quando expostas ao etoposídeo (figura 29- B).

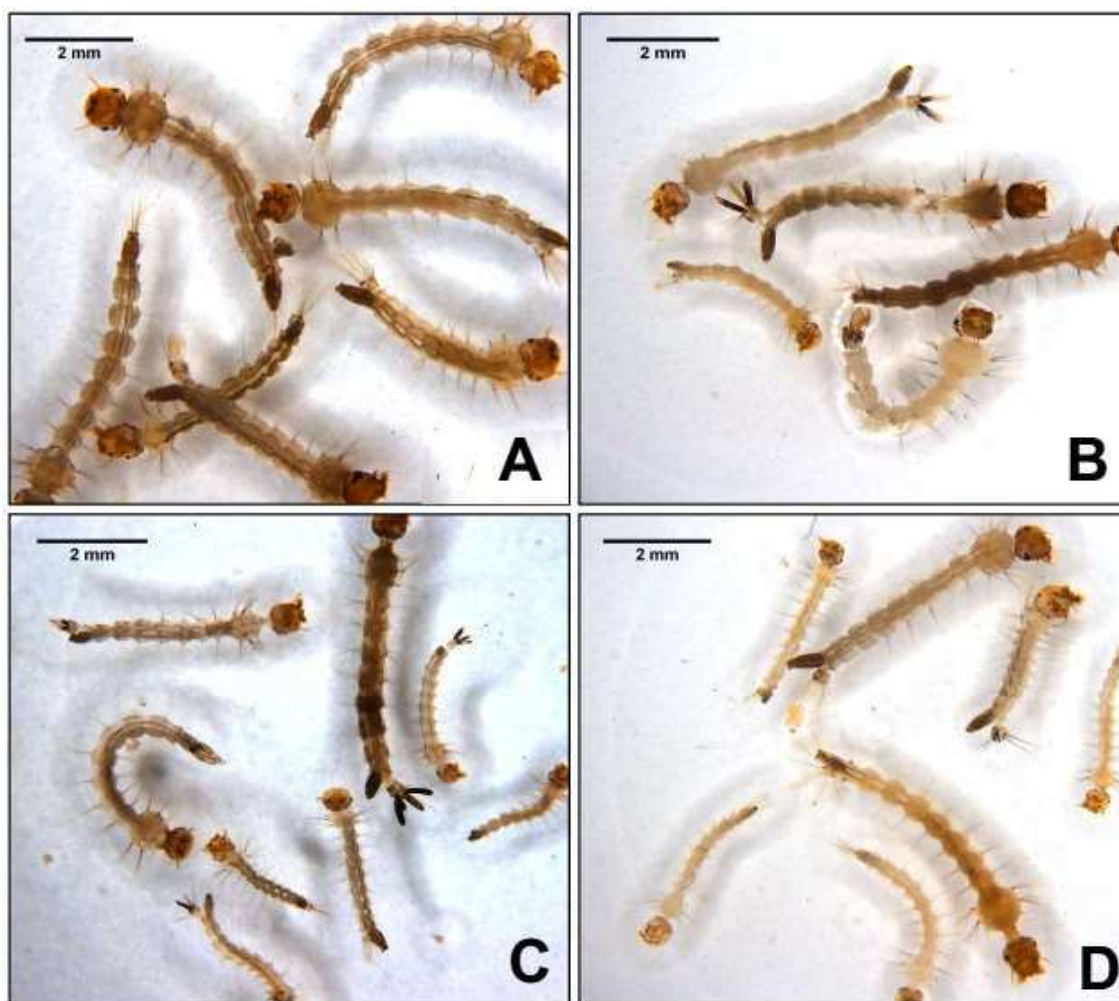
As pupas contabilizadas neste teste com inibidor (figura 29-B) levaram cerca de 3 dias no mesmo estágio e sofreram metamorfose em mosquitos adultos. A viabilidade desses mosquitos no estágio adulto não foi acompanhada neste experimento, que se ateve à verificação da mortalidade das larvas e formação de pupas no bioensaio.

#### **4.4.2 Análise da morfologia das larvas de *Aedes aegypti* expostas ao etoposídeo: bioensaio de atividade larvicida**

Além de promover uma mortalidade considerável nas larvas de *Ae. aegypti*, o tratamento com etoposídeo causou alterações morfológicas bastante notáveis nas larvas do mosquito.

Na figura 30 temos um perfil das larvas encontradas a partir do 8º dia para o controle e para as demais concentrações de etoposídeo usadas no teste (50, 100 e 200 µM). Nota-se que nesse intervalo de tempo as larvas controle apresentam características morfológicas homogêneas, respeitando o padrão de coloração e tamanho corporal do quarto estágio de desenvolvimento larval (figura 30-A), enquanto as larvas expostas ao inibidor apresentam perfil bastante heterogêneo, sendo possível observar larvas de diferentes tamanhos compatíveis com o segundo e terceiro estágio de desenvolvimento, com coloração esbranquiçada a transparente (se observadas a olho nu). Podemos observar também indivíduos com curvatura corporal atípica e apresentando alterações morfológicas no tórax e no sifão (figura 30-B, C e D). A figura 30 apresenta alguns *pools*

(ou grupos) representativos de larvas para mostrar que os efeitos do inibidor sobre o desenvolvimento e a morfologia larvais não seguem um único padrão de ação, resultando em diferentes alterações fenotípicas nas larvas expostas, quando comparadas ao controle não tratado.



**Figura 30.** Conjunto de imagens representativas de larvas de *Ae. aegypti* observadas no 8º dia de exposição ao inibidor etoposídeo. Em A temos as larvas do grupo controle (0,2% de DMSO) no 4º estágio de desenvolvimento, apresentando um perfil morfológico homogêneo entre os indivíduos. Em B, C e D temos as larvas expostas às concentrações de 50 µM, 100 µM e 200 µM de etoposídeo, respectivamente. A aquisição de todas as imagens foi feita com 10,5 × de magnificação (barra de escala em 2 mm), em microscópio estereoscópico Leica, modelo M205.

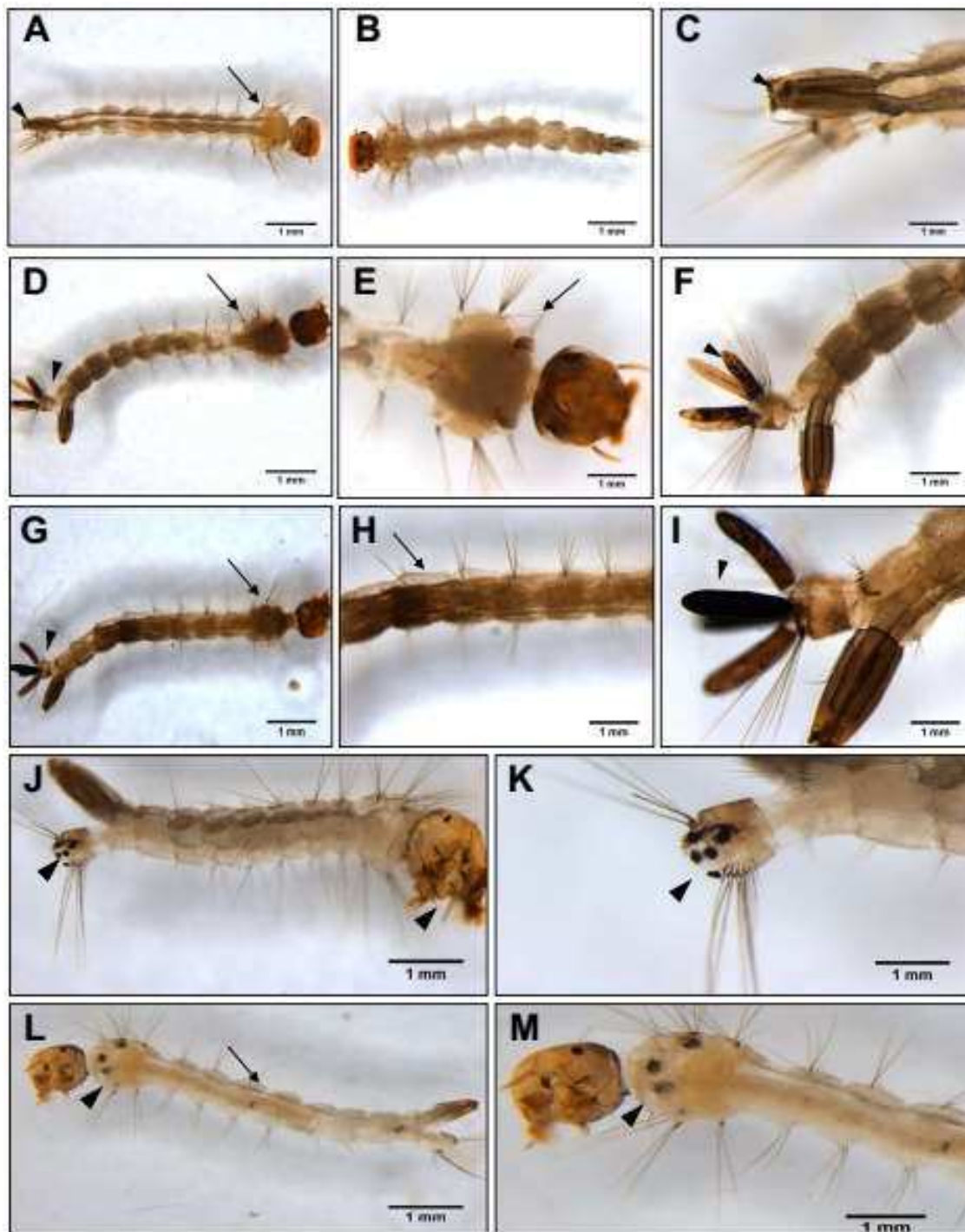
Na figura 31, as alterações morfológicas encontradas no bioensaio estão apresentadas com maior detalhamento. Na figura 31-A, B e C, podemos notar que as larvas do grupo controle de *Ae. aegypti* apresentam características típicas do quarto

estágio de desenvolvimento do mosquito, com perfil de pigmentação corporal, a anatomia corporal apresentando cabeça, tórax e os oito segmentos abdominais regulares. Como esperado, as larvas do grupo controle possuem a estrutura do segmento posterior ao abdômen (lóbulo anal) com os dois pares de brânquias (transparentes ao olho nu) e apresentam anatomia regular do sifão.

Em contraste com o grupo controle, nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  do inibidor, as larvas expostas ao etoposídeo apresentam alterações morfológicas quanto à pigmentação corporal, que apresenta uma tonalidade mais escura nas regiões do tórax e dos segmentos abdominais, incluindo o surgimento de um perfil de pigmentação atípico nos pares de brânquias anexas ao lóbulo anal, sendo essas estruturas encontradas mais infladas e com certa turgidez (figura 31-D, E, F, G, H, I).

Na figura 32-J, K, L e M, representativa do bioensaio na concentração de 200  $\mu\text{M}$  de etoposídeo, foram observados pontos bem definidos e arredondados na cor preta no tórax e na região próxima à cela incompleta do lóbulo anal das larvas. Algumas das características mais notáveis das larvas submetidas a esse tratamento são as heterogeneidades em relação aos tamanhos corporais e também a coloração mais leitosa ou transparente dos indivíduos, principalmente a olho nu, característica mais típica nos estágios larvais mais iniciais, após a eclosão dos ovos

Com relação ao tubo respiratório, que participa da composição do sifão, verificamos que essa estrutura não apresenta alterações morfológicas fenotípicas significativas ou observáveis nas magnificações empregadas, para todas as concentrações de etoposídeo utilizadas no bioensaio (figura 31).



**Figura 31. Morfologia de larvas de *Ae. aegypti* após 10 dias de exposição ao etoposídeo.** A, B e C: Controles submetidos a tratamento com 0,2% de DMSO, em A uma larva inteira com pigmentação e anatomia corporal normal (20×). Em B, uma larva na posição ventral (20×) e em C (63×) a estrutura do sifão e do conjunto de brânquias do lóbulo anal transparente característico (a seta indica o tórax e a ponta da seta à estrutura composta pelo sifão e pelo lóbulo anal). D, E e F: Larvas do bioensaio tratadas com 50  $\mu$ M de etoposídeo. Em D, uma larva inteira com pigmentação escura por toda extensão corporal (20×). Em E, o tórax larval apresentando morfologia irregular (40×) e em F, temos o rompimento do 8º segmento ligado ao

sifão e as brânquias infladas pela deposição do material escuro através do tubo corporal (40x). G, H e I: Larvas do bioensaio tratadas com 100  $\mu$ M de etoposídeo. É observada uma pigmentação mais acentuada ao longo de todo tubo corporal. Em G temos uma larva inteira (20  $\times$ ). Em H temos parte de uma larva, com a seta indicando manchas escuras ao longo dos segmentos (40  $\times$ ). Em I, temos a morfologia das brânquias completamente alterada (80  $\times$ ), com ponta da seta indicando a disposição de uma das brânquias. J, K, L e M: Larvas do bioensaio tratadas com 200  $\mu$ M de etoposídeo. Em J temos uma larva inteira com morfologia alterada no lóbulo anal e aparelho bucal (35  $\times$ ), indicados pela ponta de seta. Em K observamos manchas pretas na estrutura do lóbulo anal (80  $\times$ ). Em L, temos uma larva inteira apresentando coloração esbranquiçado-leitosa por todo corpo e alteração nas morfologias do aparelho bucal e do tórax (pontos pretos) (35  $\times$ ), com a seta indicando os segmentos e a ponta da seta o tórax. Em M temos o tórax em maior aumento (80 $\times$ ). Todas as imagens foram adquiridas em microscópio estereoscópico Leica, modelo M205 (barra de escala em 1 mm).

O bioensaio possibilitou também a observação de alterações morfológicas causadas pelo tratamento com etoposídeo na formação das pupas (figura 32). Podemos observar diferenças nas características determinantes desse estágio nas pupas dos grupos tratados, quando comparadas às pupas do grupo controle. Na figura 32-A, temos uma pupa controle com anatomia corporal regular dividida em cefalotórax (cabeça e tórax) e abdômen, apresentando um formato característico de “vírgula” quando vista de perfil. Também é possível observar as paletas natatórias com perfil característico no 8º segmento, permitindo a flutuação e os movimentos adequados na superfície da água, fatores importantes para emergência do inseto adulto.

As pupas formadas durante a exposição na concentração de 50  $\mu$ M etoposídeo não apresentaram curvatura corporal normal (o formato de vírgula), mantendo os segmentos abdominais retos após a metamorfose (figura 32-B). Esta anatomia corporal aberrante foi observada por até quatro dias, o que resultou em uma menor capacidade de flutuação desses indivíduos. As pupas encontradas na concentração de 100  $\mu$ M do inibidor, além da ausência da curvatura típica em vírgula, também apresentaram uma pigmentação escura por toda extensão do cefalotórax e abdômen (figura 32-C). Já na concentração de 200  $\mu$ M de etoposídeo, as pupas, além de não apresentarem o aspecto de vírgula característico, exibem também alterações morfológicas no 3º segmento abdominal e problemas na metamorfose durante a emergência do mosquito adulto, com um possível rompimento incompleto do cefalotórax (figura 32-D).



**Figura 32. Pupas de *Ae. aegypti* formadas durante a exposição ao inibidor etoposídeo (visão lateral).** Em A, uma pupa controle com desenvolvimento normal de suas estruturas, pigmentação normal e curvatura típica com aspecto de vírgula. A ponta da seta aponta para o cefatórax (região anterior) e a seta aponta para os segmentos abdominais (região posterior). Em B, temos a pupa formada na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de etoposídeo, com ausência da curvatura típica dos segmentos. Em C, temos a pupa formada na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo, apresentando pigmentação escura por toda extensão corporal e ausência de curvatura típica. Em D, temos a pupa formada na concentração de 200  $\mu\text{M}$  de etoposídeo, apresentando diferenças na estrutura do 3<sup>o</sup> segmento e problemas na metamorfose em adultos. Aquisição em 35  $\times$  de magnificação (barra de escala em 1 mm) para todas as imagens. As imagens foram obtidas em microscópio estereoscópico Leica, modelo M205.

#### 4.5 Efeitos do inibidor da enzima DNA topoisomerase II sobre as células de origem embrionária Aag2 de *Aedes aegypti*

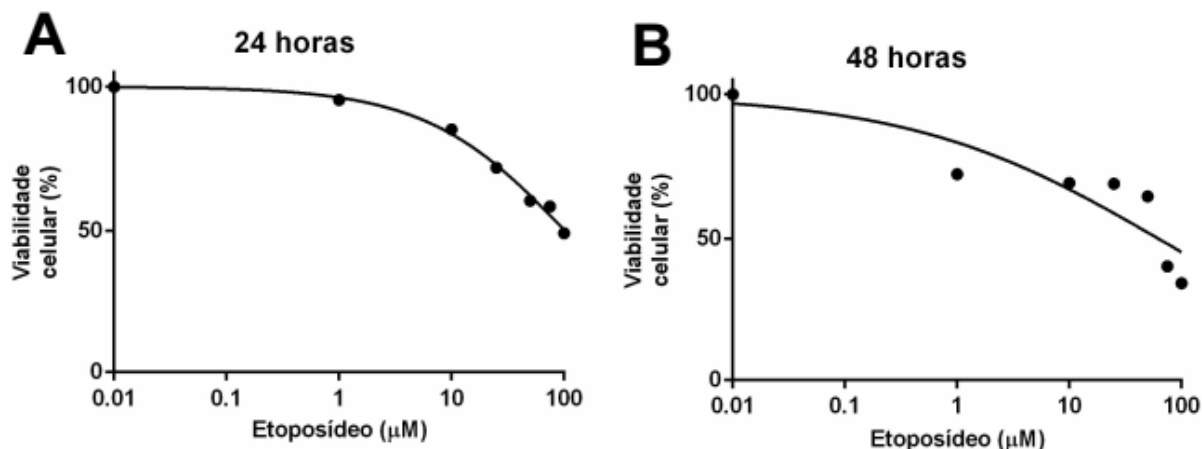
##### 4.5.1 Perfil de viabilidade celular das células Aag2 expostas ao inibidor etoposídeo: viabilidade e proliferação celular

A determinação da citotoxicidade ao etoposídeo nas células da Aag2 foi determinada pelo ensaio de redução de MTT nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  por 24,



48 horas. Através dos valores de densidade óptica (DO) obtidos em cada intervalo de exposição ao inibidor em relação ao controle observamos que o efeito citotóxico nas células é dependente da dose e do tempo de tratamento. Dessa forma, o ensaio de redução do MTT reflete a redução da viabilidade celular em consequência da concentração e tempo de exposição ao inibidor etoposídeo (figura 33).

Foram obtidas curvas para cada um dos dois tempos de tratamento estudados. As curvas foram obtidas por regressão não linear e refletem a viabilidade celular em função da concentração do inibidor etoposídeo (figura 33- A, B). A partir dessas curvas de sobrevivência foram obtidos os valores de  $IC_{50}$  médio em 24 horas (121,45  $\mu\text{M}$ ) e  $IC_{50}$  médio em 48h (64,78  $\mu\text{M}$ ), representados na tabela 2.



**Figura 33. Análise da viabilidade celular pelo método de MTT das células Aag2 expostas a concentrações crescentes do inibidor etoposídeo.** Os gráficos expressam as curvas dose resposta das células para o etoposídeo em cada tempo de exposição em relação ao controle (0,25% de DMSO). O inibidor foi usado nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ . A: 24 horas de exposição, B: 48 horas de exposição. As curvas foram obtidas através de regressão não linear com as concentrações do inibidor em escala logarítmica, utilizando o programa GraphPad Prism (v.6.01).

**Tabela 2.** Valores de  $IC_{50}$  médio em  $\mu\text{M}$  utilizando o ensaio de MTT para células Aag2 tratadas com etoposídeo (VP-16-213).

Tempo de exposição ao etoposídeo (VP-16-213)	Número de repetições experimentais (independentes)	IC <sub>50</sub> médio para células Aag2	Intervalo de confiança inferior a 95%	Intervalo de confiança superior a 95%	Desvio padrão médio do IC <sub>50</sub>
<b>24 horas</b>	N= 5	121,45	71,44	206,53	1,53
<b>48 horas</b>	N= 6	64,78	52,11	80,53	1,22

Na figura 34, a proliferação celular é expressa graficamente tanto através dos valores de DOs obtidos na leitura do teste quanto pelo percentual dos valores normalizados. Pelo fato da análise da colorimétrica ser uma medida quantitativa arbitrária do método, as duas representações gráficas permitem uma melhor interpretação da análise de proliferação celular.

A proliferação celular das células Aag2 foi avaliada em 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição com o inibidor etoposídeo nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ . No tempo de exposição de 24 horas com o inibidor apenas a concentração de 1  $\mu\text{M}$  não apresentou diferença estatística em relação ao controle ( $p \geq 0,05$ ), enquanto as demais concentrações apresentaram diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Houve também diferença significativa entre as concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ; figura 34- A). Já os percentuais de inibição da proliferação celular decresceram de 81,11% a 43,08%, conforme aumentou a concentração do inibidor (figura 34- B). Um pós teste para detecção de uma tendência linear nos dados revelou um efeito de dose na inibição da proliferação celular em 24 h de tratamento, com inclinação (*slope*) significativa de - 0,1323 ( $p < 0,0001$ ).

Os efeitos na proliferação das células são mais pronunciados nos intervalos de 48, 72 e 96 horas de tratamento para todas as concentrações de inibidor usadas no ensaio, demonstrando diferença em relação aos controles sem tratamento. Após 48 horas de exposição ao inibidor etoposídeo (figura 34- C) todas as concentrações apresentaram diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não foi detectada diferença estatística entre as concentrações no ensaio (figura 34- C). Já os percentuais de inibição da proliferação celular decresceram de 52,08% a 22,22%, para as concentrações crescentes do inibidor no ensaio (figura 34- D). O pós teste para detecção de tendência linear

nos dados revelou um efeito de dose na inibição da proliferação celular em 48 h de tratamento, com inclinação (*slope*) significativa de  $-0,1653$  ( $p < 0,0001$ ).

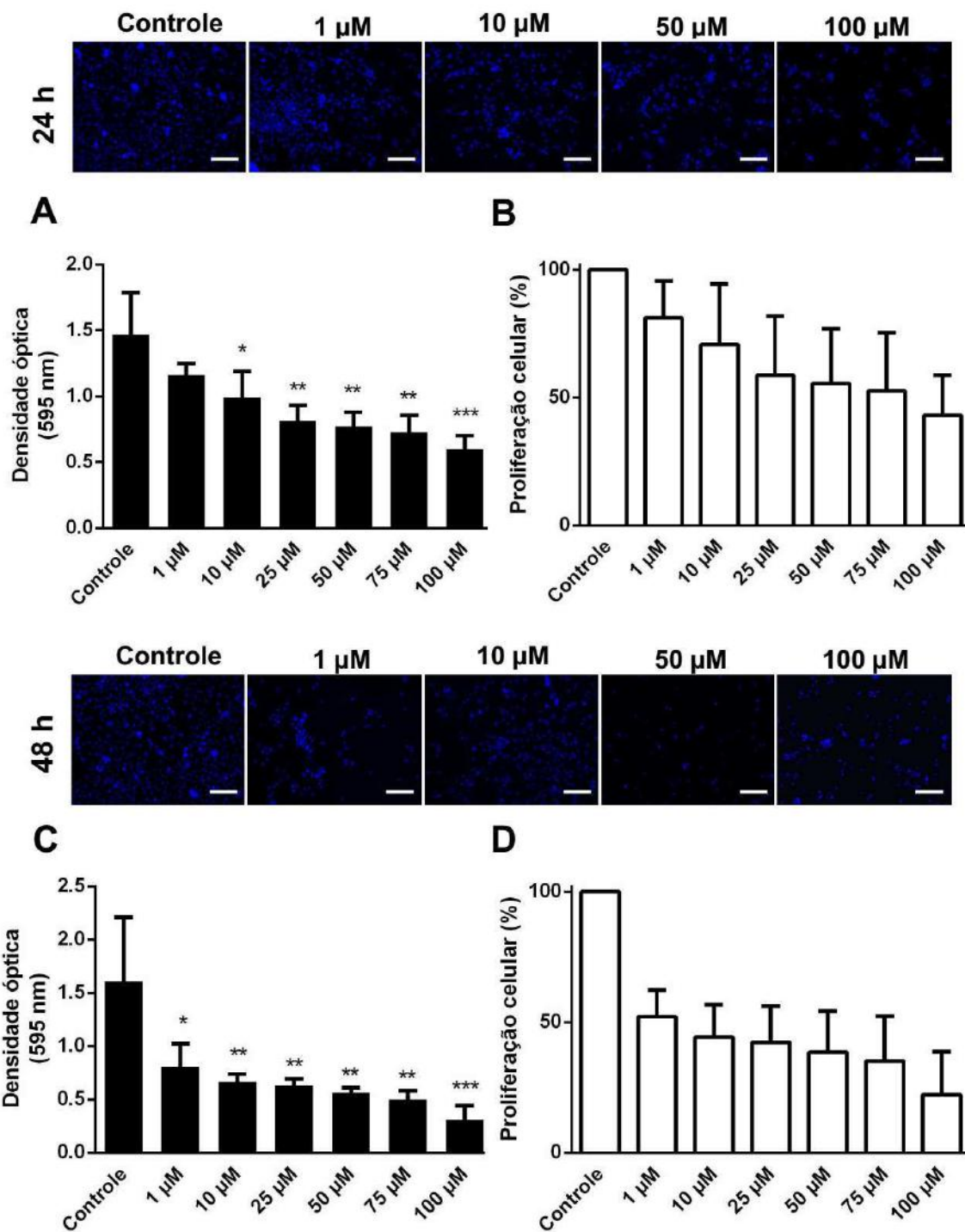
No intervalo de 72 horas de tratamento todas as concentrações apresentaram diferença estatística em relação ao controle no ensaio ( $p < 0,0001$ ). Todos os tratamentos apresentaram também diferença significativa em relação ao tratamento com  $1 \mu\text{M}$  de etoposídeo ( $p < 0,0001$ ). Entre os demais tratamentos, apenas entre  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ ,  $25 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$  e entre  $50 \mu\text{M}$  e  $75 \mu\text{M}$  não foi encontrada diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) (figura 34- E). Para esse tempo de tratamento, os percentuais de inibição da proliferação celular decresceram de  $56,91\%$  a  $9,15\%$ , para as concentrações crescentes do inibidor (figura 34- F). O pós teste para detecção de tendência linear nos dados revelou um efeito de dose na inibição da proliferação celular em 72 h de tratamento, com inclinação (*slope*) significativa de  $-0,2359$  ( $p < 0,0001$ ).

Finalmente, em 96 horas de ensaio com inibidor etoposídeo, mais uma vez todas as concentrações apresentaram diferença estatística em relação ao controle no ensaio ( $p < 0,0001$ ). Já entre as diferentes doses do inibidor no ensaio foram detectadas diferenças significativas entre  $1 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ),  $1 \mu\text{M}$  e  $75 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ),  $1 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ),  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ),  $10 \mu\text{M}$  e  $75 \mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ),  $10 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) e  $25 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) (figura 34- G). Neste tempo de ensaio os percentuais de inibição da proliferação celular decresceram de  $49,25\%$  a  $7,23\%$ , para as concentrações crescentes do inibidor no ensaio (Figura 34- H). O pós teste para detecção de tendência linear nos dados revelou um efeito de dose na inibição da proliferação celular em 96 h de tratamento, com inclinação (*slope*) significativa de  $-0,2547$  ( $p < 0,0001$ ).

Os painéis da microscopia de fluorescência em DAPI das células expostas ao inibidor demonstram o perfil (qualitativo) da distribuição dos núcleos nos tempos de exposição do ensaio (figura 34). Foi possível observar para todos os tempos (24, 48, 72 e 96 horas) uma redução do número de células se comparado aos seus respectivos controles, confirmando assim a redução do padrão proliferativo ao longo do teste.

A figura 35 ilustra o padrão de incorporação do corante cristal violeta em placa de 24 poços para 48 e 96 horas de exposição ao inibidor nas concentrações de  $1$ ,  $10$ ,  $50$  e  $100 \mu\text{M}$  de etoposídeo nas células Aag2. A densidade de células coradas com o cristal violeta se

torna menor à medida que as concentrações do inibidor aumentam no ensaio, sendo observadas como pontos em roxo na placa.



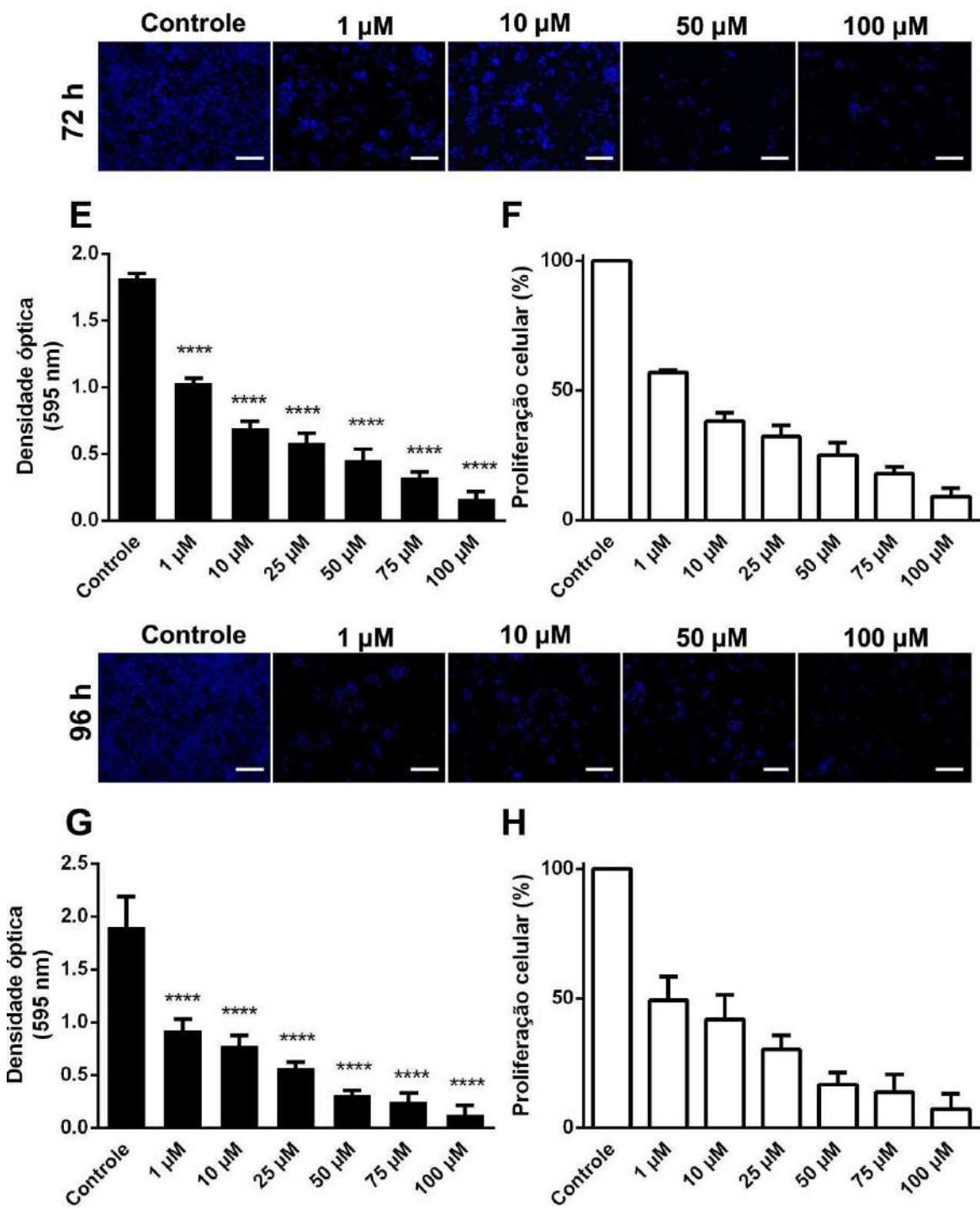
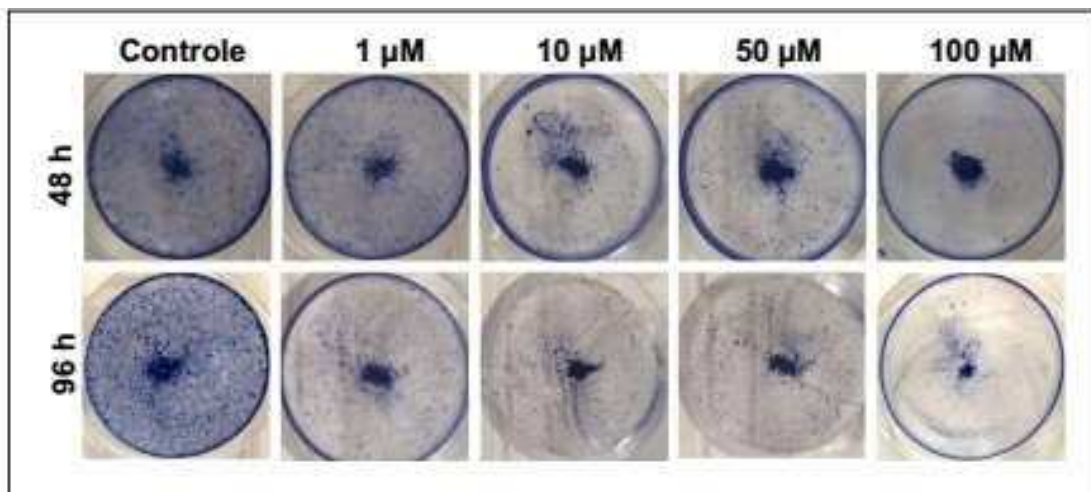


Figura 34. Análise da proliferação celular das células Aag2 expostas a doses crescentes do inibidor etoposídeo pelo método de cristal violeta. Os gráficos expressam em paralelo o perfil de proliferação

celular neste método estimado pela densidade óptica (DO) e através na normalização dos valores de DO em porcentagem. Sendo (A e B): 24 horas de exposição, (C e D): 48 horas de exposição, (E e F): 72 horas de exposição e (G e H): 96 horas de exposição. O inibidor etoposídeo foi usado nas concentrações de 1, 10, 25, 50 75 e 100  $\mu\text{M}$ . Para detecção de diferenças estatísticas foram utilizados o teste ANOVA (One Way Analysis of Variance) e o pós teste de *Tukey-Kramer (Tukey's Multiple Comparison Test)* para a comparação entre os grupos experimentais. Os asteriscos no gráfico indicam a diferença estatística entre as doses do inibidor e o controle (0,25% de DMSO). As diferenças estatísticas encontradas entre as doses não estão representadas. (\*):  $p < 0,05$ ; (\*\*):  $p < 0,01$ ; (\*\*\*):  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . Os dados foram trabalhados com o programa GraphPad Prism (v.6.01).



**Figura 35. Poços de cultura de células coradas com cristal violeta após 48 e 96 horas de exposição a doses crescentes do inibidor etoposídeo.** O inibidor foi usado nas concentrações de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , em placas de cultura de 24 poços com fundo chato. Nota-se que a desidade da cor violeta torna-se menor a medida que a concentração do inibidor aumenta no teste. Controle: 0,25% de DMSO.

#### 4.5.2 Análise morfológica das células Aag2 expostas ao etoposídeo por histoquímica com hematoxilina e eosina (HE)

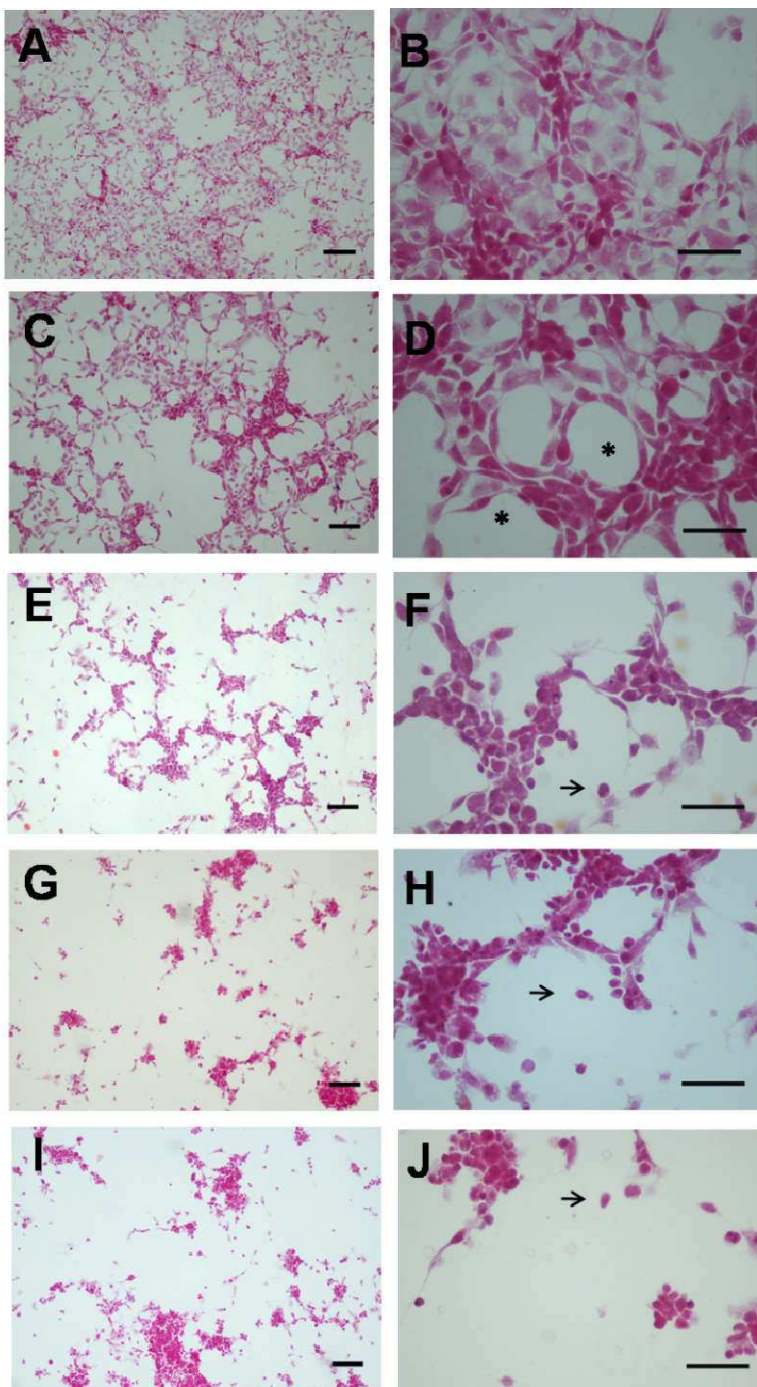
Com o objetivo de observar possíveis alterações morfológicas nas células Aag2 tratadas com etoposídeo, foi realizada uma análise histoquímica com os corantes hematoxilina e eosina (HE). Foram observadas principalmente alterações morfológicas no volume citoplasmático destas células, pois obtivemos uma coloração reduzida dos núcleos pela hematoxilina com esse método de coloração.

Na figura 36 e 37 as imagens são dispostas em paralelo em duas magnificações diferentes, possibilitando a comparação entre proporção celular e os contatos célula-célula. Assim, na histoquímica com HE observamos uma perda gradual da uniformidade do citoplasma das células que constituem as monocamadas nos intervalos de tempo de

48 e 96 horas de exposição ao etoposídeo. Com o tratamento, as células passam a assumir uma morfologia arredondada, com redução ou ausência de junções celulares e com grande redução do conteúdo do citoplasma, característica denominada como retração citoplasmática (KERR, 1993).

Em 48 horas os efeitos do inibidor são mais pronunciados em 10  $\mu\text{M}$  (figura 36-E e F), 50  $\mu\text{M}$  (figura-36 G e H) e 100  $\mu\text{M}$  (figura-36 I e J), com células apresentando uma morfologia mais arredondada e sem projeções aparentes (indicado pelas setas). Apesar do volume de células coradas em HE demonstrarem um perfil de adesão semelhante ao controle, é possível notar a formação de espaços bem definidos (indicado por asteriscos) à medida que as células retraem do substrato (figura 37). Para esse mesmo tempo de tratamento, a concentração de 1 $\mu\text{M}$  (figura 37- C e D) produz alterações mais sutis nas células em cultura.

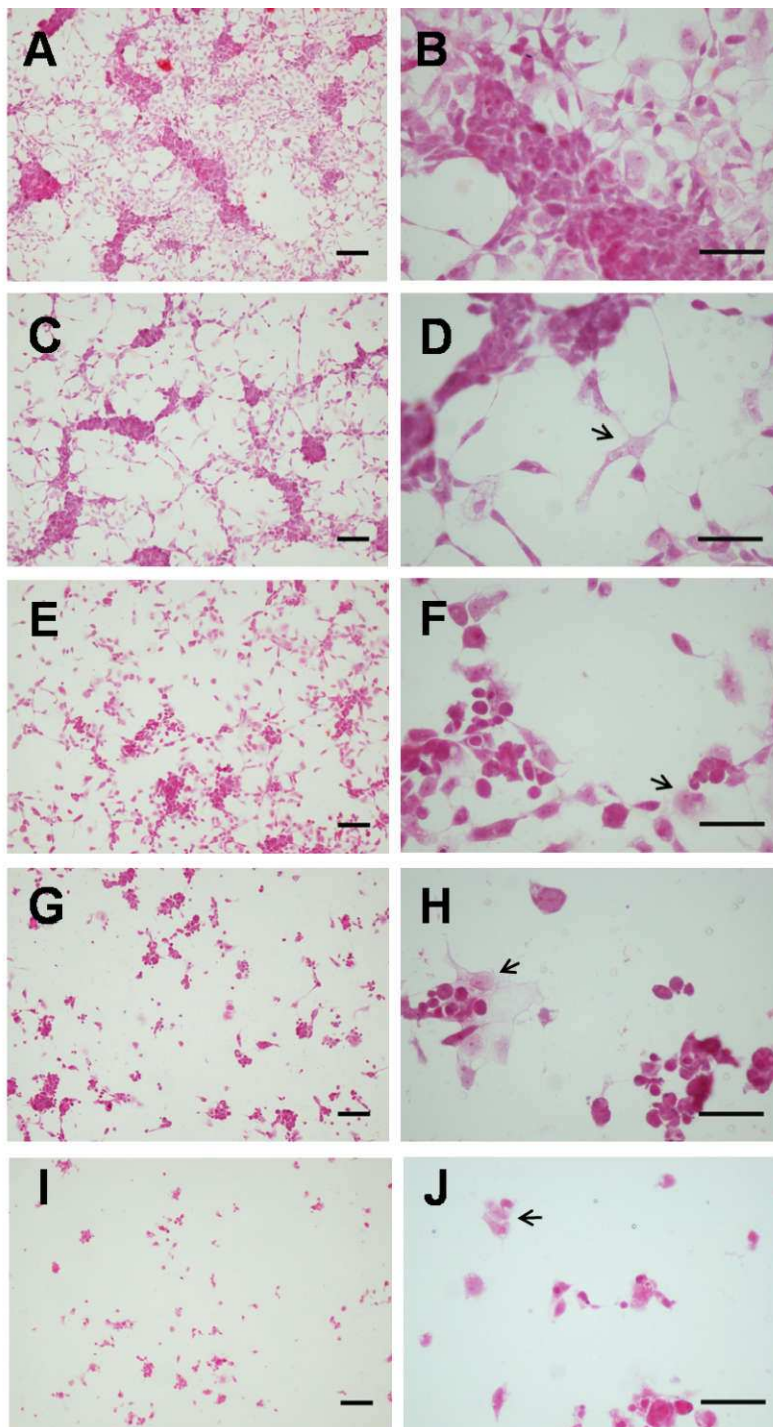
Em 96 horas de tratamentos efeitos do inibidor são evidentes até mesmo na menor concentração de 1  $\mu\text{M}$  (figura 37-C e D) e se tornam mais pronunciados a medida que a concentração do etoposídeo aumenta no ensaio, como pode ser observado nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  (figura 37- E e F), 50  $\mu\text{M}$  (figura 37- G e H) e 100  $\mu\text{M}$  (figura 37- I e J). Os danos celulares são acentuados pelo maior tempo de exposição ao inibidor, podendo ser observados pela presença de um citoplasma residual que se cora mais fracamente com eosina (indicado pela seta) (figura 37- D, F e H).



**Figura 36. Alterações morfológicas das células Aag2 após o tratamento com etoposídeo por 48 horas.** Culturas de células Aag2 tratadas com diversas concentrações de etoposídeo foram coradas com hematoxilina/eosina e observadas em microscopia óptica de campo claro. Em (A-B) temos o controle (0,25% de DMSO) e os tratamentos nas concentrações de 1  $\mu$ M (C- D), 10  $\mu$ M (E-F), 50  $\mu$ M (G-H) e 100  $\mu$ M (I e J). Os asteriscos indicam alterações na monocamada de células e as setas apontam para retração citoplasmática (células arredondadas e isoladas). As barras de escala representam 100  $\mu$ m (painéis à esquerda) e 50  $\mu$ m (painéis à direita). A análise das imagens foi feita com base em três experimentos independentes em triplicata, sendo três ou mais imagens capturadas de cada repetição, em diferentes



aumentos por campo de observação. A aquisição das imagens foi realizada no microscópio Nikon, modelo Eclipse 80i.



**Figura 37. Alterações morfológicas das células Aag2 após o tratamento com etoposídeo por 96 horas.** Culturas de células Aag2 tratadas com diversas concentrações de etoposídeo foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscopia óptica de campo claro. Em (A-B) temos o controle (0,25% de DMSO) e os tratamentos nas concentrações de 1  $\mu$ M (C- D), 10  $\mu$ M (E-F), 50  $\mu$ M (G-H) e 100  $\mu$ M (I e J). As setas apontam para possíveis restos ou resíduos citoplasmáticos e células com morfologia

citoplasmática muito alterada. As barras de escala representam 100  $\mu\text{m}$  (painéis à esquerda) e 50  $\mu\text{m}$  (painéis à direita). A análise das imagens foi feita com base em três experimentos independentes em triplicata, sendo três ou mais imagens capturadas de cada repetição, em diferentes aumentos por campo de observação. A aquisição das imagens foi realizada no microscópio Nikon, modelo Eclipse 80i.

#### **4.5.3 Análise das alterações morfológicas nucleares causadas pelo inibidor etoposídeo nas células Aag2**

Por meio de análises de microscopia óptica das células Aag2 é possível investigar alguns dos efeitos celulares da inibição da atividade da enzima DNA topoisomerase II. Em conjunto, a análise morfológica das células Aag2 expostas ao etoposídeo empregando a microscopia óptica de fluorescência com DAPI (que revela os núcleos celulares) e a microscopia óptica de contraste de fase nos permitem uma observação do perfil dos núcleos e também sobre algumas das estruturas celulares e do volume citoplasmático na presença do inibidor.

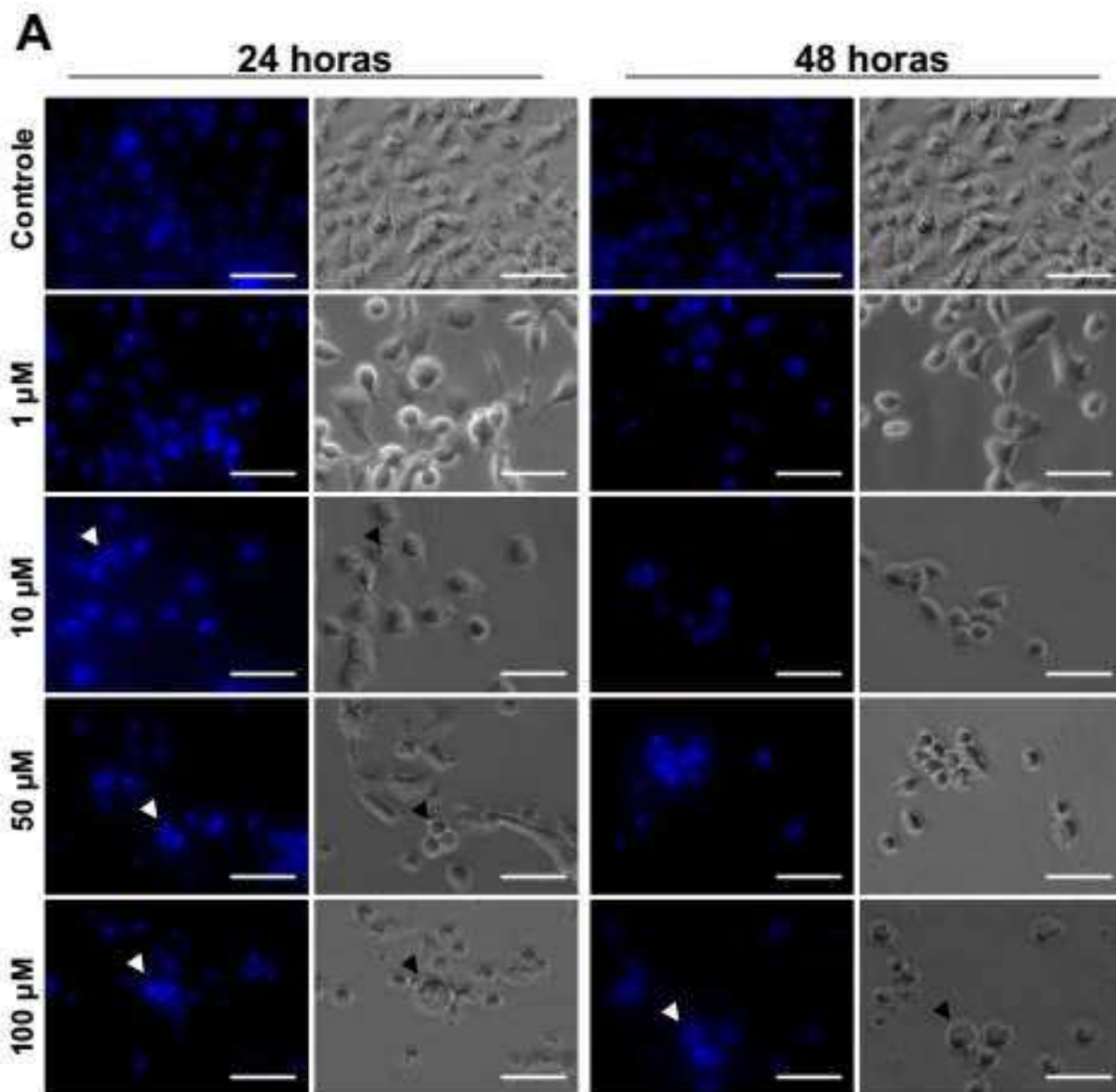
Através da fluorescência com DAPI observamos alteração no perfil característico dos núcleos, quando comparamos com o controle, que pode ser notado ao longo dos tempos de exposição e para todas as concentrações de etoposídeo usadas no ensaio (1, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) (figura 38- A e B).

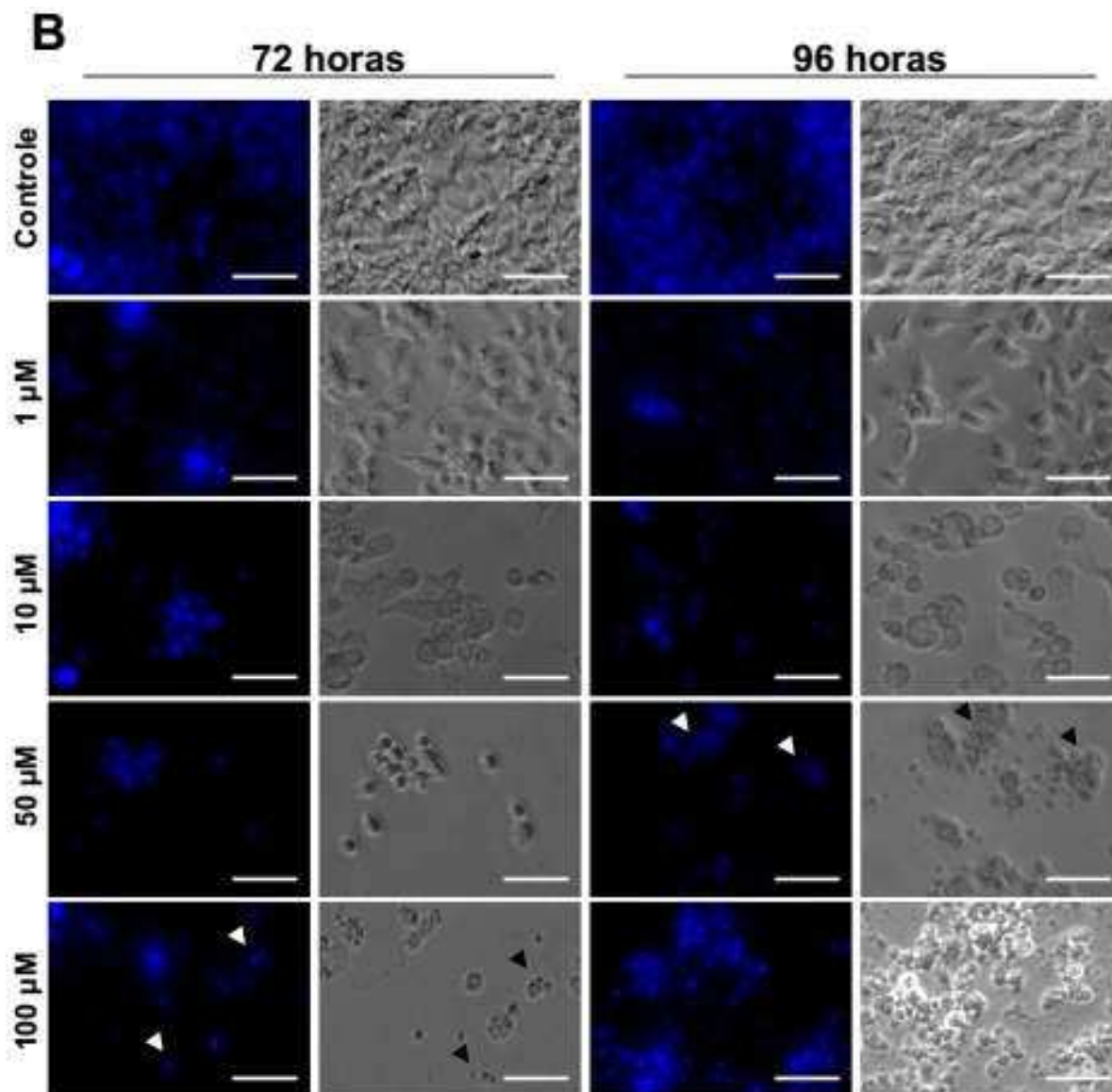
De uma forma geral podemos observar que as células passam a se apresentar isoladas e com aparência mais irregular em 24 e 48 horas de tratamento com as diversas concentrações de etoposídeo (figura 38-A). Com 24 horas de ensaio para as concentrações de 10 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , já é possível observar núcleos picnóticos (cuja cromatina está extremamente condensada) e núcleos fragmentados, com morfologia atípica característica de núcleos apoptóticos (indicado pelas pontas de setas na figura 38-A, painel 24 horas).

Em 48 horas de exposição ao etoposídeo fica mais nítida a condensação da cromatina e a fluorescência dos núcleos se tornam menor e mais centralizada (em 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ). Nesse intervalo de tempo os núcleos fragmentados estão mais presentes na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo (figura 38-B). O perfil de alteração morfológica nos núcleos se mantém nos tempos mais extensos do ensaio (72 e 96 horas, figura 38- B, respectivamente). Também nesses intervalos de tratamento, a concentração de 100  $\mu\text{M}$  é que apresenta os efeitos mais drásticos na fragmentação nuclear.

As células submetidas a tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de etoposídeo apresentaram uma menor capacidade proliferativa quando comparadas aos controles. Entretanto, apesar de demorarem mais para se dividir, essas células apresentam poucas alterações morfológicas observáveis, quando comparadas às culturas sem tratamento (figura 38- B).

Com relação à morfologia celular geral, com a microscopia óptica de contraste de fase, podemos observar que os controles sem tratamento crescem para formar uma cultura em monocamada, com suas superfícies bem espalhadas e aderidas sobre o substrato. Já para a maior parte dos tratamentos, em especial para 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , o espalhamento das células pelo substrato é muito menor. Além disso, a área observável do citoplasma parece reduzida e bastante justaposta ao núcleo, se comparado com a microscopia óptica de fluorescência com DAPI (figura 38), sugerindo que esteja ocorrendo uma retração citoplasmática. O tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo é o que mais afeta a morfologia das células, que já em 24 horas de tratamento se encontram anormalmente arredondadas (figura 38- A). Para essa concentração, o tempo 96 horas exhibe o aspecto característico de um amontoado de restos celulares (figura 38- B).





**Figura 38. Perfil dos núcleos e morfologia celular das células Aag2 após o tratamento com etoposídeo.** No painel A temos 24 e 48 horas de exposição e no painel B temos 72 e 96 horas de exposição nas concentrações de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  respectivamente para todos os tempos observados. As microscopias da fluorescência dos núcleos em Dapi e contraste de fase das células estão dispostas em paralelo respeitando o mesmo campo. A aquisição das imagens foi realizada no microscópio invertido de fluorescência Leica, modelo DMI4000 B, em magnificação de 63 $\times$ . Todas as barras de escala apresentam comprimento de 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.6 Avaliação da morte por apoptose em células Aag2 expostas ao inibidor etoposídeo

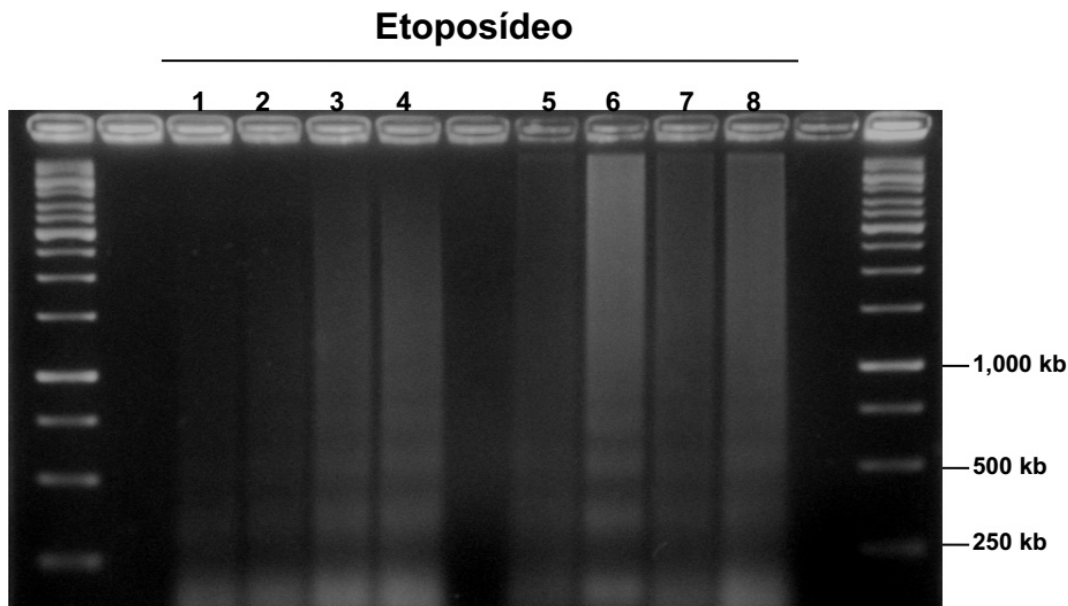
### 4.6.1 Fragmentação internucleossômica do DNA

A degradação do DNA por DNAses endógenas é uma característica bioquímica da apoptose, onde as caspases efetoras ativas ativam as DNAses (em particular a enzima CAD – *Caspase Activated DNase*), o que faz com que ocorra a degradação parcial do DNA nuclear em regiões internucleossômicas, gerando fragmentos de DNA em múltiplos de 200 pares de bases, que podem ser observados em gel de agarose com um padrão clássico de “escada” (ARENDS et al., 1990).

Para investigar a degradação regulada do DNA nuclear das células Aag2 de *Ae. aegypti* tratadas com o etoposídeo extraímos o DNA total das células após 48 e 96 horas de tratamento com esse inibidor e o submetemos à eletroforese em gel de agarose. O gel do DNA genômico das células expostas ao inibidor etoposídeo nas concentrações de 10 $\mu$ M (2 e 6), 50 $\mu$ M (3 e 7), 100  $\mu$ M (4 e 8) e o controle (1, 5) por 48 horas (1, 2, 3 e 4) e 96 horas (5, 6, 7, 8) demonstra fragmentação do DNA nestas amostras em ambos os intervalos de tempo (48 e 96 horas), com um “padrão de escada” compatível com o perfil de fragmentação internucleossômica do DNA genômico característica da apoptose (figura 39).

Durante 48 horas de exposição ao etoposídeo o perfil de degradação internucleossômica do DNA genômico é menor na concentração de 10  $\mu$ M e se torna mais acentuado nas concentrações de 50 $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Podemos notar também que a cultura controle apresenta morte celular apoptótica em níveis basais. Esse cenário sugere um efeito dose dependente do inibidor etoposídeo sobre a apoptose nessas células (figura 39).

Em 96 horas observamos que a intensidade da degradação do DNA internucleossômico nas células Aag2 é mais evidente nas concentrações de 10 e 100  $\mu$ M do etoposídeo, comparadas aos níveis de fragmentação vistos no controle. Já em 50  $\mu$ M o perfil de degradação internucleossômica do DNA está aparentemente reduzido (figura 39).



**Figura 39. Fragmentação internucleossômica do DNA de células Aag2 expostas ao etoposídeo.** Gel de agarose 1,8% submetido à eletroforese e corado com brometo de etídeo. As raias numeradas de 1 a 4 correspondem a culturas tratadas durante 48 horas com etoposídeo, nas doses de 10  $\mu$ M (raia 2), 50  $\mu$ M (raia 3), 100 $\mu$ M (raia 4) ou com o veículo/controle (0,25% de DMSO; raia 1). As raias numeradas de 5 a 8 correspondem a culturas tratadas durante 96 horas com etoposídeo, nas doses de 10  $\mu$ M (raia 6), 50  $\mu$ M (raia 7), 100  $\mu$ M (raia 8) ou com o veículo/controle (0,25% de DMSO; raia 5). No poço inicial e final do gel visualizamos o padrão de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). A presença de bandas com o tamanho das menores bandas do padrão é um indicativo de apoptose nas células expostas ao etoposídeo.

#### 4.6.2 Marcação das células Aag2 com Anexina V-FICT e iodeto de propídeo

Os resultados observados no ensaio de marcação das células Aag2 com Anexina V-FICT (marcador da exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática) e iodeto de propídeo (PI; marcador do DNA e do comprometimento da permeabilidade da membrana plasmática). Esses experimentos tiveram como objetivo promover uma possível interpretação dos efeitos do inibidor e do curso temporal dos estágios iniciais da morte por apoptose nessas células.

Sabemos que para uma melhor correlação dos eventos observados nesta sessão é necessária a quantificação do sinal fluorescente de cada marcador empregado aqui nos tratamentos em questão. Todavia o conjunto de dados será mencionado de forma preliminar no referido trabalho apenas de forma qualitativa, analisando a presença (marcação positiva) ou ausência (marcação negativa) de PI e Anexina- V-FICT sem aspectos proporcionais na interpretação da técnica.

Após 6 horas de exposição ao inibidor etoposídeo (figura 40-A), as células apresentam marcação positiva para Anexina V e PI de forma mais evidente nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , se comparadas ao controle sem tratamento. Esses dados sugerem que muitas das células nesse tratamento estejam em um estado mais avançado da apoptose, com exposição de fosfatidilserina e comprometimento da permeabilidade da membrana. Curiosamente, a marcação de Anexina-V foi bem mais intensa no tratamento de 50  $\mu\text{M}$  do que nas demais concentrações do inibidor, sugerindo que os eventos de morte celular programada tenham se iniciado antes para essa concentração do inibidor.

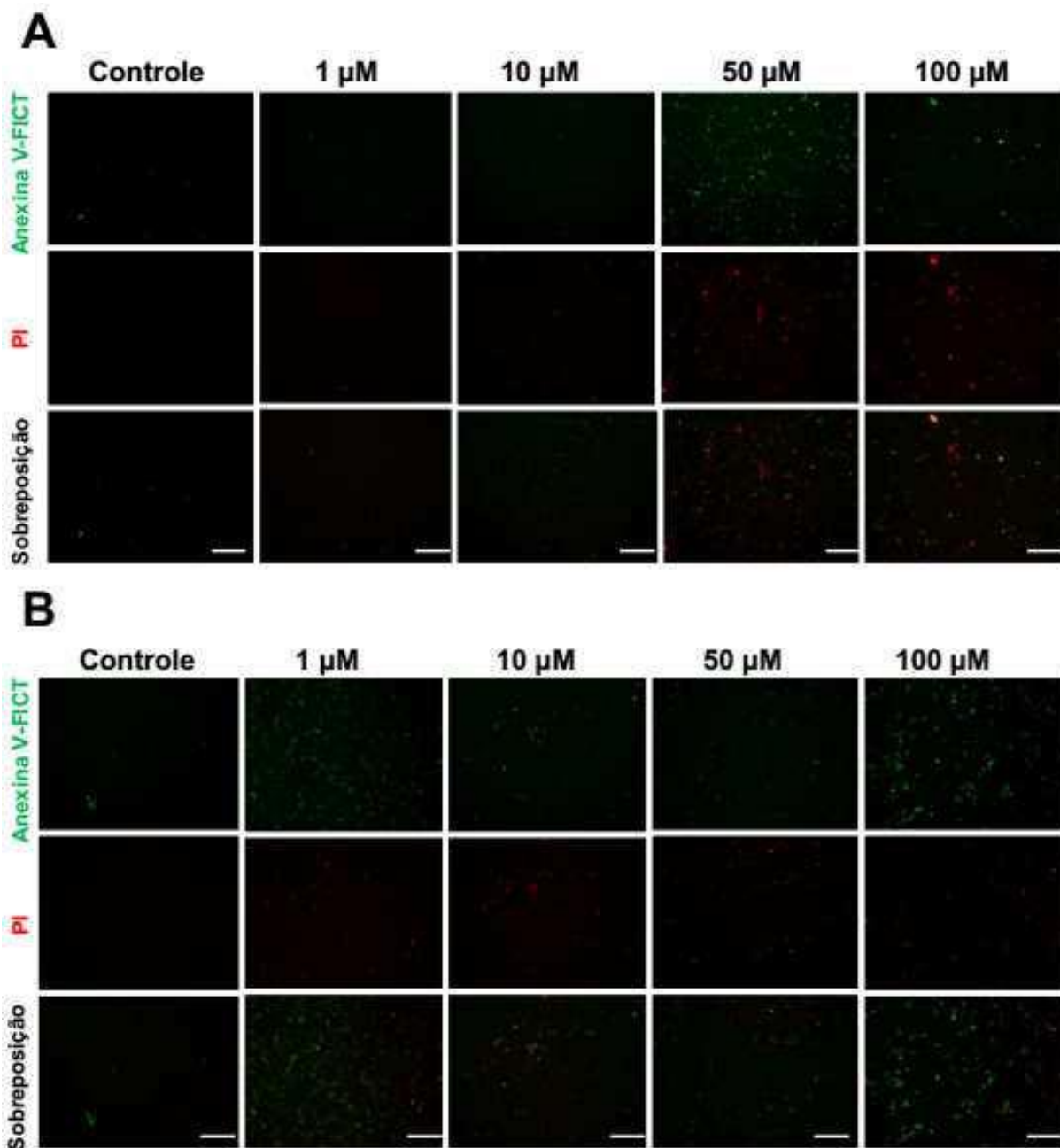
Em 18 horas de exposição ao etoposídeo (figura 40- B), a marcação positiva para Anexina V é mais evidente nas concentrações de 1 e 100  $\mu\text{M}$  do ensaio, se comparadas ao controle e ao tempo de 6 horas. A marcação para PI se encontra de forma semelhante e pouco intensa em todos os tratamentos. Portanto, é possível que em 18 horas, para esses dois tratamentos, uma proporção significativa das células se encontre nos estágios iniciais da apoptose, com exposição de fosfatidilserina em suas superfícies, sem terem ainda sofrido a redução na permeabilidade da membrana plasmática.

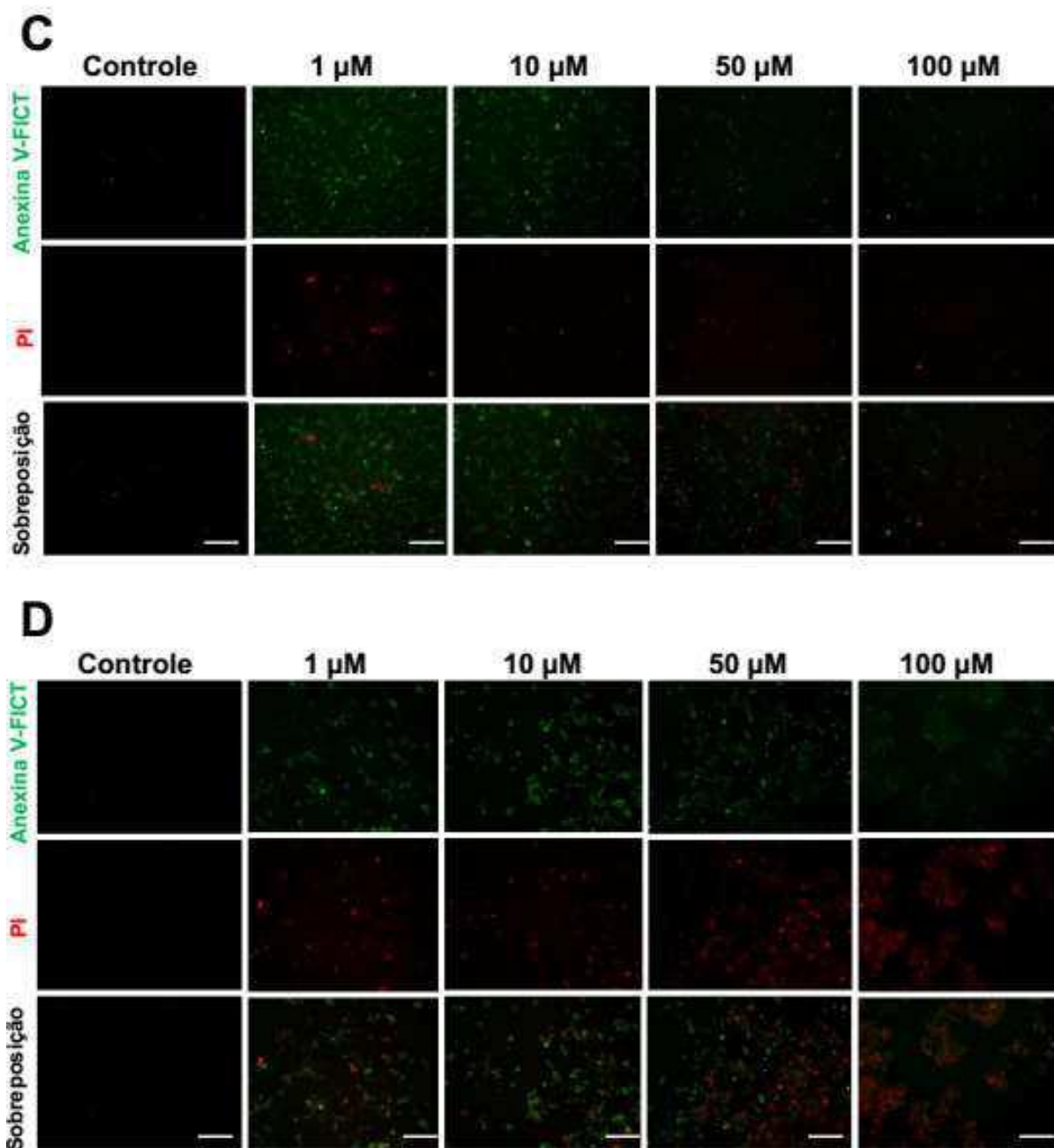
O perfil de marcação em 24 horas de exposição ao inibidor apresenta marcação positiva para Anexina-V mais pronunciada nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$  do ensaio, cobrindo em verde toda área observada, enquanto fica bastante reduzida para as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ . Já a marcação para PI é mais evidente em 1  $\mu\text{M}$ , apresentando uma maior área de observação em vermelho. Esse perfil sugere que uma proporção significativa das células tratadas com 1  $\mu\text{M}$  se encontra em um estado mais avançado da apoptose, com exposição de fosfatidilserina e comprometimento da permeabilidade da membrana, enquanto muitas das células tratadas com 10  $\mu\text{M}$  estão ainda nos estágios mais iniciais, sem comprometimento da permeabilidade da membrana (figura 40-C).

No último ponto de observação, após 48 horas de exposição ao etoposídeo (figura 40- D), observamos que ocorre a intensificação da marcação positiva para Anexina-V e PI em todas as concentrações de etoposídeo usadas do ensaio. O padrão de distribuição



dos marcadores ocorre de forma semelhante nas células nesse tempo experimental. Essa marcação sugere que a maior parte das células se encontra nos estágios mais avançados da morte apoptótica no tempo de 48 horas, para todas as concentrações do inibidor.





**Figura 40. Marcação com iodeto de propídeo e Anexina V-FICT para análise da morte celular por apoptose em células Aag2 expostas ao etoposídeo (6,18, 24 e 48 horas).** As células foram expostas ao inibidor nas nas concentração de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , por 6 horas (painel A), 18 horas (painel B), 24 horas (painel C) e 48 horas (painel D). O painel referente a cada tempo de tratamento trás no quadrante superior a marcação positiva para anexina V-FICT, no quadrante intermediário a marcação positiva para iodeto de propídeo e no último quadrante a sobreposição das duas marcações. A aquisição das imagens foi realizada no microscópio invertido de fluorescência Leica, modelo DMI4000 B, em magnificação de 20  $\times$ . Todas as barras de escala apresentam comprimento de 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.7 Avaliação do ciclo celular de células Aag2 utilizando citometria de fluxo

Com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* sobre o ciclo celular das células embrionárias Aag2, empregamos uma abordagem de citometria de fluxo, na qual o método utilizado foi baseado na avaliação da incorporação de iodeto de propídeo no DNA em células fixadas e permeabilizadas (DARZYNKIEWICZ; HUANG, 2004). Neste ensaio foi estimada a proporção de células em cada fase do ciclo celular ou em apoptose, pela medida da intensidade da fluorescência para cada gotícula contabilizada pelo citômetro de fluxo. O ensaio seguiu um curso temporal (6, 18, 36 e 48 horas) para as três concentrações (10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) do etoposídeo, as quais as células Aag2 foram expostas.

A análise dos resultados de citometria de fluxo nesta sessão faz uma abordagem referente aos perfis encontrados nos histogramas em diferentes tempos de exposição ao inibidor, não se atendo aqui aos dados quantitativos, em porcentagem, demonstrado nos painéis. A descrição deste resultado teve como objetivo descrever os possíveis eventos causados nas células por fase do ciclo celular.

Na figura 41, os histogramas controles são representativos de células não tratadas após 18 horas do início do experimento. O tempo de 18 horas é também representativo dos controles nos demais tempos experimentais e apresenta um perfil convencional de ciclo celular, com aproximadamente 37% das células em fase G1/G0 (2C, com C correspondendo ao conteúdo de DNA de uma célula haplóide) e 54% em G2/S/M (>2C até 4C). Curiosamente, cerca de 8,5% das células é encontrada com 4 conjuntos de cromossomos homólogos (8C). Essa última população parece assumir um perfil tetraplóide, aparente como um terceiro pico no histograma. Assim as comparações realizadas nos tratamentos fazem alusão a este perfil gráfico controle.

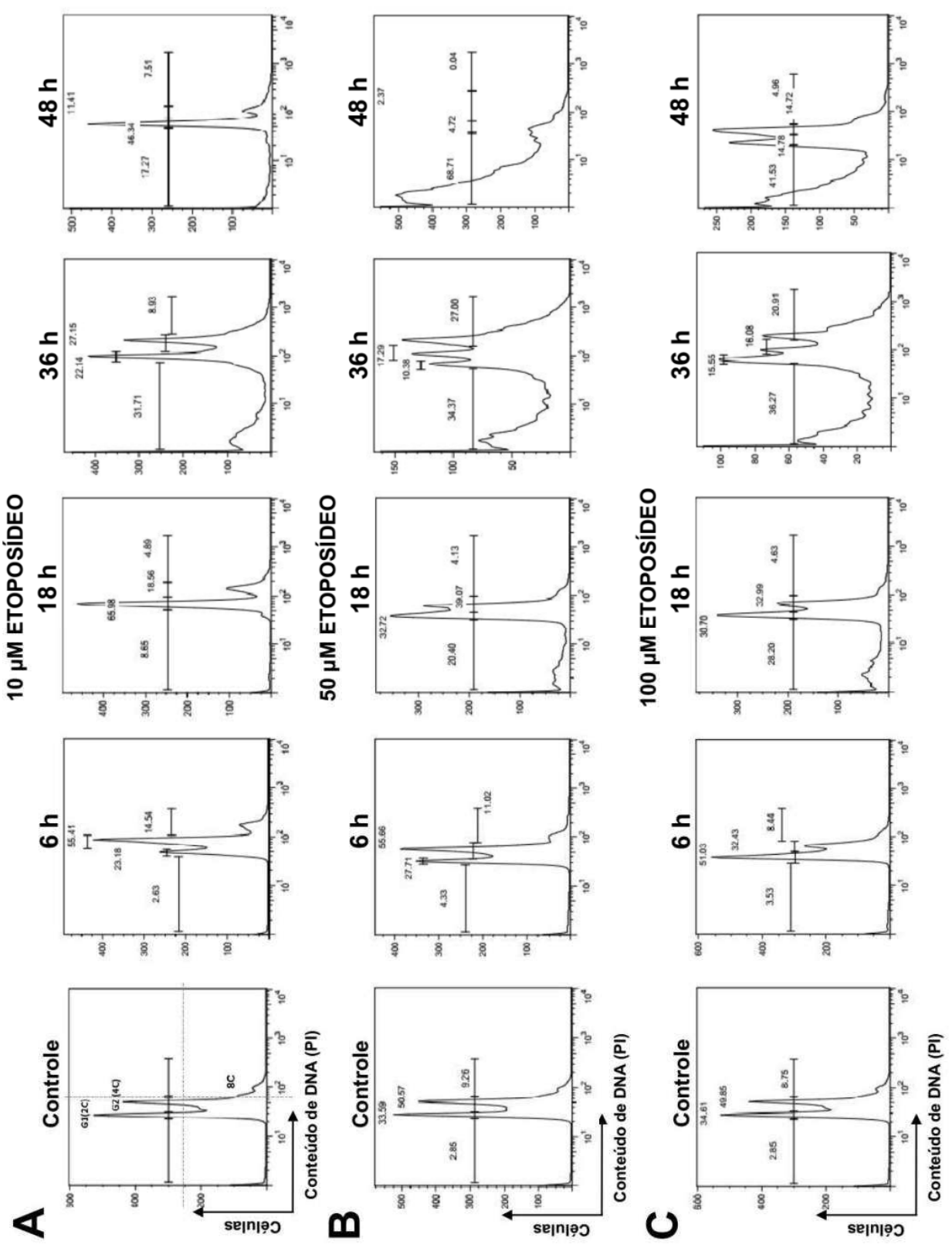
Durante a exposição com 10  $\mu\text{M}$  de etoposídeo (figura 41- A), no histograma de 6 horas notamos que a proporção de células em G1/G0 e S/G2/M se inverte quando comparamos com o controle. Em 6 horas de tratamento temos quase duas vezes mais células em S/G2/M do que em G0/G1. Já a população tetraplóide sofre um aumento perceptível, dobrando sua quantidade em relação aos controles sem tratamento. Em 18 horas de tratamento observamos que a população de células em G1 se esgota e que a

maioria das células se encontra em S/G2/M. Observamos mais uma vez um aumento na população tetraplóide. Já em 36 horas desse tratamento continuamos observando a ausência de G1/G0, com a maioria das células em S/G2/M. Além disso, a população tetraplóide atinge seus níveis mais altos, quase se equiparando à população de células em S/G2/M. Nesse mesmo ponto de tempo podemos perceber que uma população considerável de células sofreu apoptose, havendo uma quantidade considerável de corpos apoptóticos na região do histograma próxima da origem. Finalmente, em 48 horas de tratamento, quase a totalidade das células se encontra em S/G2/M, com a população tetraplóide reduzida para níveis próximos aos dos controles sem tratamento. Tomados em conjunto, os dados da figura 41-A sugerem que, quando tratadas com 10  $\mu$ M de etoposídeo, ao menos parte das células sob estudo sofre bloqueio do ciclo celular no ponto de checagem do final de G2, enquanto outra parte passa por uma fase M sem desenlace cromossômico e gera uma população com quantidade duplicada de cromossomos. Além disso, com o decorrer do tempo de tratamento, parte das células, provavelmente as que ficaram bloqueadas em G2, entram gradativamente em apoptose (figura 41-A).

Quando tratadas com 50  $\mu$ M de etoposídeo (figura 41- B), as células Aag2 apresentam um perfil que apresenta algumas semelhanças e diferenças com o tratamento de 10  $\mu$ M. Em 6 horas de tratamento observamos mais uma vez uma inversão na proporção de células em G1/G0 e S/G2/M, embora não tão acentuada quanto visto para 10  $\mu$ M. Percebe-se também um aumento discreto na população de células tetraplóides. Em 18 horas, ao contrário do observado para 10  $\mu$ M, não ocorre um esgotamento de G0/G1 e a população em S/G2/M diminui. Após 36 horas de exposição ao inibidor a população total de células decresce bastante (observar escala no eixo vertical do histograma). As células ainda vivas se distribuem em três populações, com uma quantidade menor de células em G0/G1, níveis intermediários em S/G2/M e uma quantidade um pouco maior no estado de tetraploidia (figura 41- B). Finalmente, no intervalo de ensaio de 48 horas é possível observar uma intensificação da mortalidade nas três populações celulares, embora picos remanescentes dos três conjuntos permaneçam próximos da base do histograma. Em conjunto os dados sugerem que, na concentração de 50  $\mu$ M do inibidor, uma proporção significativa das células sofre apoptose já em 18 horas de tratamento, possivelmente devido a um bloqueio do ciclo

celular na transição G2/M (e talvez em G1/S). Parte significativa da população parece escapar desse bloqueio para assumir um estado de tetraploidia. Entretanto, ao final do tratamento, a maioria das células está morta, restando apenas populações residuais (figura 41- B).

Para a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo (figura 41-C), em 6 horas temos um cenário distinto do observado para as outras duas concentrações do inibidor. Nessa concentração, ao invés de observarmos uma inversão entre os picos de G0/G1 e S/G2/M, foram identificados um grande acúmulo de células em G0/G1 e a diminuição da população em S/G2/M. Já o pico tetraplóide não está disponível. Em 18 horas de ensaio o cenário de acúmulo em G0/G1 permanece, embora muitas células que estavam em G0/G1 em 6 horas tenham sofrido apoptose, diminuindo assim relação de tamanho entre os picos G0/G1 e G2. Em 36 horas a população de G0/G1 decresce em relação à população em S/G2/M. Observa-se também um grande percentual de corpos apoptóticos e um aumento na intensidade do pico G2, indicando que parte das células que estavam retidas em G1 sofreu apoptose, enquanto outras acabaram progredindo para S e G2. No histograma de 48 horas a tendência de morte celular acentuada permanece. Observamos 3 picos em baixa intensidade (notar a escala no eixo vertical), em que a maior parte da células remanescentes se encontram G0/G1 e quantidades menores e equivalentes estão em S/G2/M e em estado de tetraploidia. Aparentemente uma pequena população permanece ainda retida em G0/G1, outra é retida em G2 e outra conseguiu passar por G2/M e entrou em estado de tetraploidia. É possível que os corpos apoptóticos vistos em 48 horas sejam provenientes de todas essas 3 sub populações, que parecem estar degenerando gradativamente ao longo do tempo (figura 41-C).



**Figura 41. Histogramas de ciclo celular obtidos por citometria das células Aag2 expostas ao inibidor etoposídeo por 6, 18, 36 e 48 horas.** Os histogramas expressam o número de células (ou eventos contabilizados pelo leitor) com relação à intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo (PI) incorporado ao DNA. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA por célula, definindo as populações em diferentes fases do ciclo celular. As células em G2/M do ciclo possuem o dobro de DNA das células na fase G1 (assim como G0), enquanto os corpos apoptóticos apresentam menos DNA marcado do que as células em G0/G1. Os painéis com os histogramas demonstram as populações celulares expostas a 10  $\mu$ M (A), 50  $\mu$ M (B) e 100  $\mu$ M (C) de etoposídeo. Os controles em cada painel representam populações representativas submetidas a 0,25% de DMSO durante 18 h. Para fins de orientação, na área do painel do histograma do controle A estão indicadas as fases G1 e G2 e o seu conteúdo de DNA haplóide (C). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur XP5 e os histogramas produzidos com o programa *Flow Jo Collectors Edition*.

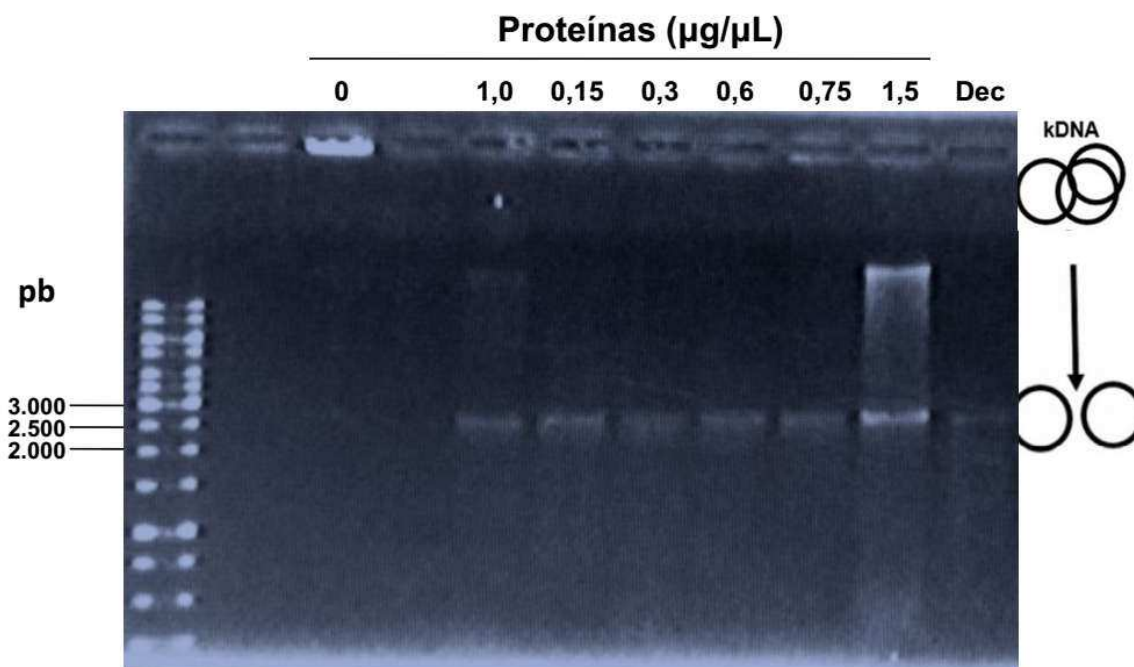
#### 4.8 Ensaio de atividade da DNA topoisomerase II: decatenação do kDNA

No presente trabalho foi utilizado kDNA comercial de *Crithidia fasciculata* para realização dos ensaios de decatenação. Esse kDNA contém cerca de 5000 minicírculos (2,5 kb cada) e 25 maxicírculos (37 kb cada) interconectados (CAVALCANTI et al., 2011). Os minicírculos liberados das redes de kDNA pela ação da enzima topoisomerase II presente no extrato de células do mosquito *Aedes aegypti* (Aag2) podem ser visualizados facilmente em eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Na sua forma catenada, o kDNA não pode entrar na malha do gel de agarose 1% (sendo visualizado retido na origem do gel), enquanto os minicírculos liberados pela ação da topoisomerase II migram pelo gel e podem ser observados na altura de aproximadamente 2500 pb.

A análise da influência da concentração de um extrato de proteínas nucleares na atividade de decatenação do kDNA demonstrou que as concentrações de 0,15, 0,3, 0,6 e 0,75  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteínas eram igualmente capazes de promover uma atividade ótima de decatenação do kDNA. Nessas concentrações de proteína houve formação de um produto do tamanho esperado para a liberação dos minicírculos e que, quando visualizado no gel, pode ser comparado ao padrão do kDNA decatenado (Dec) (figura 42). Em contrapartida, verificamos que nas concentrações maiores de 1 e 1,5  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteínas, além da liberação dos minicírculos também havia a formação de outros produtos no gel,

indicando a importância da diluição do extrato nuclear bruto para avaliar a atividade da DNA topoisomerase II nesse ensaio *in vitro*.

Além da demonstração do perfil de atividade por concentração de proteínas, nesse ensaio também confirmamos a presença da enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* no extrato de proteínas nucleares, assim como a conservação da sua atividade *in vitro*, pois na ausência de proteínas do extrato nuclear não houve decatenação do kDNA (figura 42).

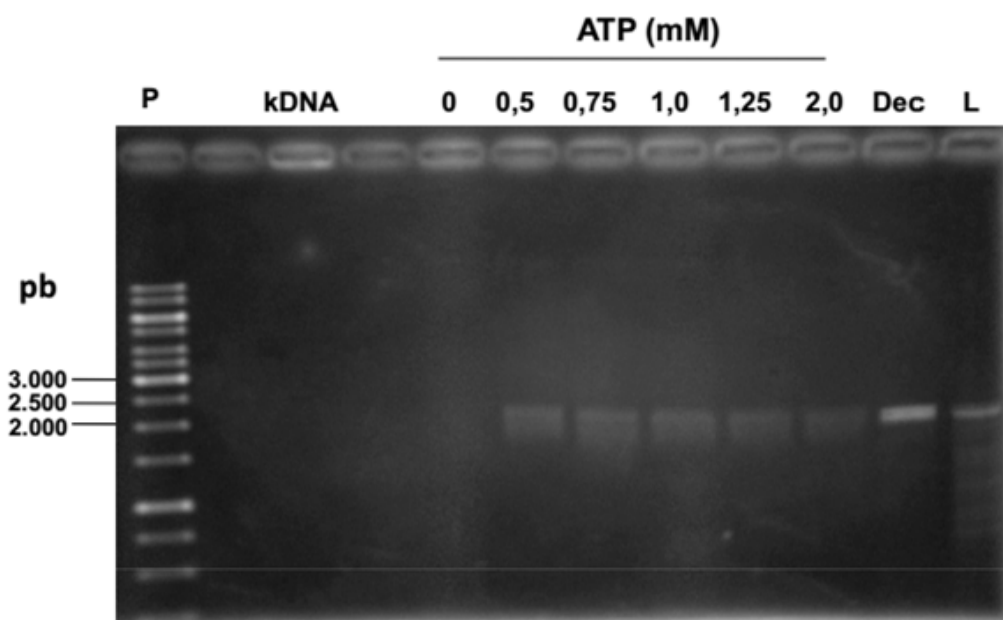


**Figura 42. Perfil de atividade de decatenação promovida pela DNA topoisomerase II em diferentes concentrações de proteínas nucleares de células *Aag2*.** As reações de decatenação do kDNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. As diversas raia no gel representam reações com 0,15, 0,3, 0,6, 0,75, 1,0 e 1,5 µg/µL de proteínas nucleares. 0: ausência de proteínas no ensaio, P: padrão de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Scientific™), Dec: padrão do kDNA de *C. fasciculata* decatenado.

Conforme visto anteriormente (item 1.2.6), as DNA topoisomerasas do tipo II dependem da hidrólise de ATP para completarem seu ciclo catalítico. Portanto, utilizamos o ensaio de decatenação do kDNA para avaliar a dependência de ATP pela enzima de *Ae. aegypti*, assim como para determinar a concentração ótima desse nucleotídeo a ser empregada nos ensaios com proteínas nucleares do mosquito. Com relação à dependência de ATP, a formação do produto não foi observada quando o nucleotídeo não



foi adicionado à reação (figura 43). A formação do produto ocorreu em todas as concentrações de ATP utilizadas, entretanto a partir de 1mM de ATP a atividade de liberação dos minicírculos foi reduzida, como pode ser visto pela formação de uma banda mais fraca no gel para as reações com concentração de 1,25 e 2 mM de ATP. Assim demonstramos que a reação de decatenação ocorre de forma favorável nas concentrações de 0,5, 0,75 e 1 mM de ATP por reação, com um perfil de liberação de minicírculos semelhante (figura 43).

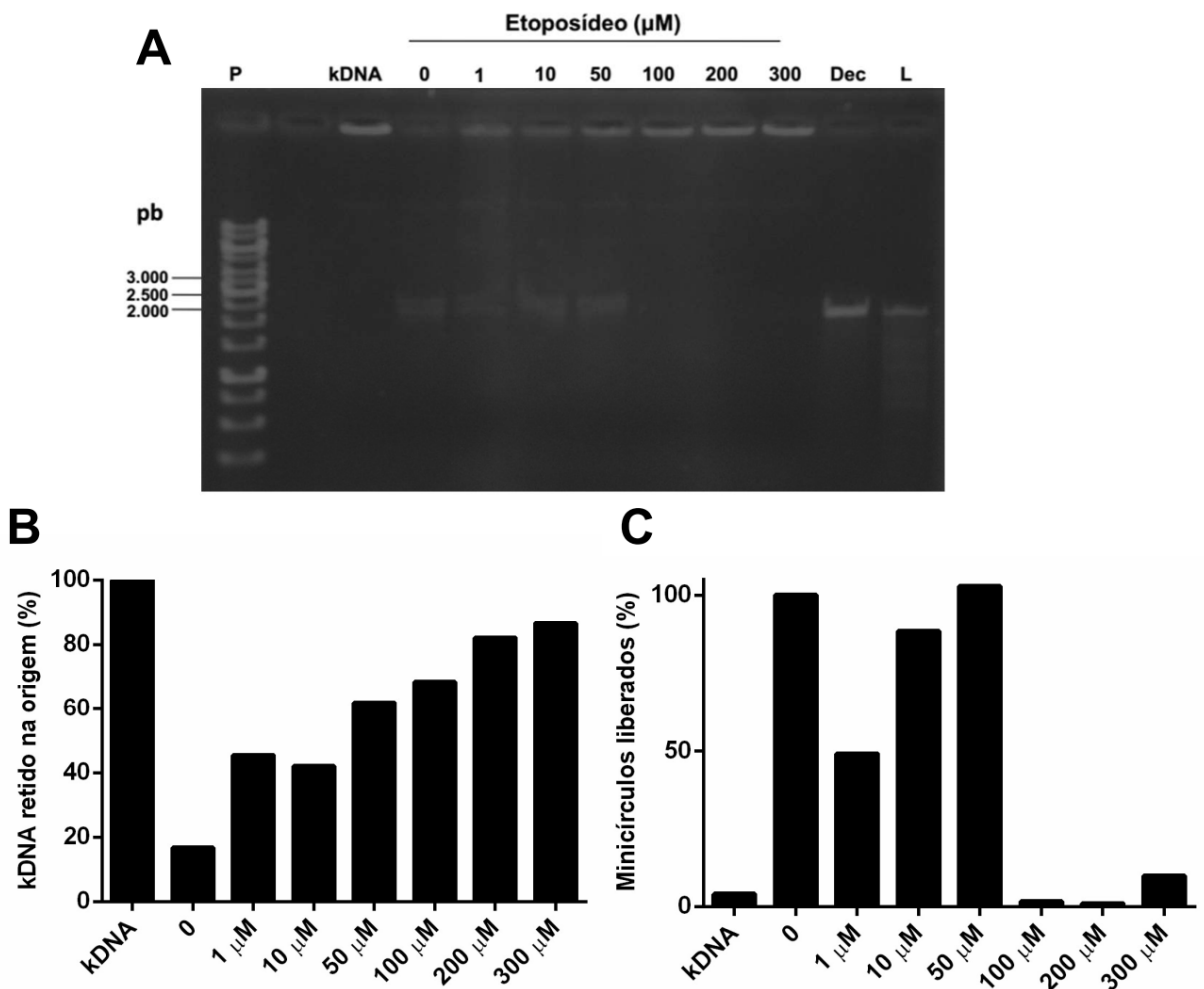


**Figura 43. Perfil de atividade de decatenação do kDNA em diferentes concentrações de ATP.** As reações de decatenação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. As diversas raias no gel representam reações com ausência de ATP e em 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 e 2,0 mM de ATP. kDNA: ensaio na ausência de extrato nuclear. P: padrão de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™). Dec: padrão do kDNA de *C. fasciculata* decatenado. L: padrão do kDNA de *C. fasciculata* linearizado.

Com o objetivo de avaliar se o inibidor etoposídeo (VP-16-213) de fato é capaz de inibir a atividade da enzima DNA Topoisomerase II de *Ae. aegypti*, a inibição da atividade de decatenação da topoisomerase II *in vitro*, o extrato nuclear foi submetido à incubação com as concentrações de 1, 10, 50, 100, 200 e 300µM de etoposídeo ou com apenas 0,2% de DMSO (controle) (figura 44- A). Nesse ensaio as concentrações de 1, 10 e 50 µM de etoposídeo promoveram a decatenação parcial do kDNA, resultando na formação do produto esperado pela liberação do minicírculo no gel, porém é possível observar que

diferentemente do controle, parte do DNA fica retido na origem do gel para estas concentrações. Enquanto na ausência do inibidor, sob as mesmas condições de ensaio a reação de decatenação ocorre quase totalmente no controle (figura 44- A).

As concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de etoposídeo foram capazes de inibir totalmente a atividade de decatenação da DNA topoisomerase II de células de *Ae. aegypti in vitro*, como pode ser observado na visualização do gel nestas concentrações em relação ao controle do ensaio. Podemos também relacionar o efeito do inibidor na reação ao comparar a origem do gel das concentrações (100, 200 e 300  $\mu\text{M}$ ) com a origem do gel que representa o kDNA na ausência do extrato nuclear. Assim demonstramos, através da visualização do gel, que nestas condições de ensaio o etoposídeo é capaz de inibir parcialmente ou totalmente a atividade específica de decatenação realizada pela enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti in vitro* no gel (figura 44- A). Da mesma forma, pela quantificação do perfil de bandas no gel, a quantidade do kDNA retido na origem do gel pode ser relacionada com aumento da concentração do inibidor no ensaio (figura 46-B). Este resultado que também foi demonstrado pela quantificação da liberação dos minicírculos no respectivo ensaio, sendo evidenciada uma maior inibição da reação de decatenação a partir de 50  $\mu\text{M}$  de etoposídeo (figura 44- C).



**Figura 44. Perfil de atividade de decatenação de kDNA na presença do inibidor etoposídeo.** As reações de decatenação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O gel com reação na ausência do inibidor e nas concentrações de 1, 10, 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de etoposídeo por ensaio de decatenação (A). O gráfico em B apresenta a quantificação por densitometria do DNA retido na origem. O gráfico em C apresenta a quantificação por densitometria da liberação dos minicírculos no gel. kDNA: ensaio na ausência de extrato nuclear. P: padrão de peso molecular (1kb). Dec: padrão do kDNA de *C. fasciiculata* decatenado. L: padrão do kDNA de *C. fasciiculata* linearizado. A quantificação por densitometria das bandas presentes no gel foi realizada com o programa *ImageJ* (v. 1.46).

## 5. DISCUSSÃO

As enzimas DNA topoisomerases II são altamente especializadas em promover alterações topológicas na molécula de DNA, atuando em muitos eventos associados ao metabolismo do DNA, como a replicação, a transcrição, a recombinação, a condensação e a segregação cromossômica (ANDERSON; ROBERGE, 1992; NITISS, 2009; LEE; BERGER, 2019). Devido aos papéis essenciais que desempenham nesses eventos, as DNA topoisomerases II foram colocadas em destaque nas últimas décadas como alvo no desenvolvimento de terapias antitumorais e antiparasitárias (CHEESMAN, 2000; ALI et al., 2014; BJORNSTI; KAUFMANN, 2019). Neste contexto, a enzima em questão se trata de um importante alvo molecular a ser estudado em agentes causadores de doenças. Assim o presente trabalho faz uma caracterização estrutural e funcional da enzima DNA topoisomerase II em aspectos que envolvem a biologia do vetor *Ae. aegypti*, causador de diversas arboviroses que atingem os países tropicais, o que o torna um modelo de estudo de grande importância para a saúde pública.

A identificação da sequência nucleotídica e peptídica prevista foi realizada por busca no banco de dados do NCBI, com acesso nº XP001656142. Uma única sequência foi encontrada e designada como DNA topoisomerase II do mosquito *Ae. aegypti* (*AeTop2*). As análises da sequência da enzima *AeTop2* identificaram uma proteína prevista com cerca de 82,6% de probabilidade para localização subcelular no compartimento nuclear, apresentando uma sequência específica candidata a NSL (*Nuclear Localization Signal*) próxima da extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica prevista (figura 12). O transporte de proteínas para o compartimento nuclear é possibilitado por sequências sinal, denominadas como sinais de localização celular ou NLSs (GARCIA-BUSTOS; HEITMAN; HALL, 1991). Estas sequências apresentam algumas características, tais como: (a) curtas sequências de aminoácidos básicos [lisina (K) ou arginina (R)]; (b) estas sequências devem ser expostas na superfície da proteína a fim de serem reconhecidas por receptores do tipo importinas; (c) tais sequências, que não necessariamente são localizados em uma das extremidades da proteína e não são removidas após a translocação da proteína (ALBERTS et al., 2009).

Muitas proteínas nucleares apresentam esse tipo de sinal em suas estruturas, como as polimerases, os receptores para hormônios esteróides, a nucleoplasmina, centenas de fatores de transcrição e as DNA topoisomerases (DINGWALL; LASKEY, 1991). Podendo o sinal ser classificado como do tipo encontrado no antígeno-T do vírus SV-40, constituído por apenas uma pequena sequência de aminoácidos básicos (exemplo: PKKKRKV), ou do tipo bipartido, que é composto por dois trechos básicos independentes, sendo o primeiro trecho (extremidade N-terminal da sequência NLS) constituído por pelo menos dois resíduos básicos, seguido de uma região espaçadora de tamanho e composição variáveis e que é sucedida pelo segundo trecho básico, que por sua vez contém pelo menos cinco resíduos, dos quais pelo menos três são básicos (CHRISTIE et al., 2016). A NLS da AeTop2 (PAAKRGRKKDSGSSEDEKPKKKAKKK) foi identificada *in silico* como sendo do tipo bipartido e está localizada entre as posições 1.460 e 1.485, com score geral de 9,4 na análise realizada.

A análise do alinhamento múltiplo demonstra uma alta conservação dos resíduos de aminoácidos ao longo das sequências de *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* e *H. sapiens* (figura 12). A composição dos resíduos na DNA topoisomerase II de insetos é similar à da isoforma alfa humana para os domínios funcionais (GyrB e GyrA), para os motivos de ATPase e TOPRIM e para o resíduo de tirosina (Y) 82, que se liga ao DNA durante o ciclo catalítico da enzima, configurando aproximadamente 70% de identidade ao longo dos resíduos alinhados. Nossos resultados de análise são compatíveis com enzimas DNA topoisomerases da classe enzimática IIA, onde todas as DNA topoisomerases são descritas compartilhando alta similaridade de sequência (SHAIU; HU; HSIEH, 1999).

Também foi possível observar substituições de resíduos no sítio de dimerização e pequenas variações ao longo do alinhamento. Segundo, Mirski e Gerlach (1999), as DNA topoisomerases IIA variam em apenas 170 resíduos de aminoácidos na região GyrB e no domínio C-terminal, região onde identificamos a NLS previsto para proteína de *Ae. aegypti*. O domínio C-terminal é descrito como sendo espécie específica, apresentando similaridade considerável apenas entre espécies muito relacionadas. Além disso, as sequências contidas nesta região são normalmente envolvidas no endereçamento celular e na interação com outras proteínas (SHAIU; HU; HSIEH, 1999).

Como já mencionado, os vertebrados possuem duas isoformas da DNA

topoisomerase II, classificadas como alfa e beta. A expressão da isoforma alfa é descrita como restrita às células em proliferação, enquanto a isoforma beta também é expressa em células quiescentes (AUSTIN et al., 2018). Já os invertebrados em geral apresentam apenas uma isoforma da DNA topoisomerase II. As nossas reconstruções filogenéticas (figura 13) para as topoisomerases II de 14 metazoários estão de acordo com as descrições evolutivas para essa classe enzimática, onde as DNA topoisomerases II nos artrópodes divergem em um clado destino das enzimas dos cordados, em ambos os métodos de análise utilizados (*Neighbor-Joining* e *máxima parcimônia*). É provável que o surgimento de duas isoformas (alfa e beta) dessa enzima somente nos vertebrados não seja derivado de uma simples duplicação gênica de seu *locus*, mas proveniente de eventos massivos de duplicações genômicas, que ocorreram na base da evolução dos vertebrados. De fato, um padrão semelhante é também observado para milhares de outros genes de vertebrados. Acredita-se que a disponibilização de novas cópias gênicas derivadas de eventos de duplicação genômica permitiu o desenvolvimento de muitas características inovadoras nos vertebrados (DEHAL; BOORE, 2005; BLOMME et al., 2006; PRACHUMWAT; LI, 2008).

A predição da estrutura tridimensional da proteína DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* através da metodologia de modelagem por homologia teve como objetivo produzir um modelo com o qual pudéssemos avaliar a interação dessa enzima com o inibidor comercial etoposídeo, bem caracterizado nesta enzima, validando assim o uso dessa molécula em ensaios funcionais *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o modelo estrutural dessa enzima poderá ser empregado em abordagens *in silico* de desenvolvimento/rastreamento de potenciais inibidores farmacológicos destinados ao controle do vetor. Utilizamos a isoforma beta da DNA topoisomerase II humana como molde para construção do modelo da proteína do vetor *Ae. aegypti* (*AeTop2*), por apresentar melhor resolução estrutural e também por estar complexada ao inibidor (WU et al., 2011). O etoposídeo é um dos inibidores mais estudados das DNA topoisomerases II de mamíferos, sendo empregado clinicamente na quimioterapia de tumores pulmonares e de testículo (HEVENER et al., 2018). Além disso, diversos estudos mostram que o etoposídeo inibe a DNA topoisomerase II em *Drosophila melanogaster*, um inseto díptero como o *Ae. aegypti* (FREI; WÜRGLER, 1996; TORRES; CREUS; MARCOS, 1988; POLTRONIERI et al.,

1997; SORTIBRÁN; TÉLLEZ; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, 2006).

A enzima humana Top2- $\beta$  compartilha cerca de 60% de identidade em sua sequência peptídica com a enzima do *Ae. aegypti* e após a construção do modelo a semelhança estrutural se mostrou bastante evidente. Na análise da sobreposição das estruturas molde e modelo, obteve-se o valor de RMSD de 0,104 Å, com 8.188 átomos envolvidos ao longo da sobreposição (figura14). Tais valores são compatíveis com os requisitos para obtenção de estruturas por modelagem comparativa (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Após as etapas de refinamento e otimização de sua geometria, o modelo do homodímero da AeTop2 atingiu parâmetros favoráveis dentro das análises previstas comparadas ao molde (3QX3) em nossos resultados. De forma que nosso modelo refinado da AeTop2 foi considerado satisfatório pela alto percentual de resíduos em regiões favoráveis, visto que nessa análise a predição ideal para estrutura proteica deve apresentar mais de 90% de seus resíduos nas regiões favoráveis e, se possível, nenhum nas regiões muito desfavoráveis ou não permitidas (LASKOWSKI et al., 1993). Tomados em conjunto, tanto a análise do gráfico de Ramachandran, quanto os valor dos desvios RMSD e posterior as análises do local da energia potencial e valores de Z-score indicaram que o modelo refinado da enzima AeTop2 tem boa qualidade e se apresenta consistente, ao menos do ponto de vista de sua geometria-estrutural, com estruturas previamente elucidadas (figuras 15: quadro 4, 16 e 17).

Em relação à estrutura tridimensional, o molde (3QX3) e o modelo refinado (AeTop2) apresentam uma alta semelhança estrutural, com diferenças mais concentradas em regiões com possível formação de alças no modelo da enzima de *Ae. aegypti* (figura 18). Entretanto, as diferenças nessas regiões de alça não são de fato comparáveis em termos estruturais com o molde utilizado, uma vez que estas alças foram resolvidas computacionalmente apenas na estrutura tridimensional do modelo e consistem em regiões mais desordenadas na proteína humana que foram omitidas na obtenção da estrutura do molde 3QX3 no PDB a partir do cristal. Observamos ainda que as estruturas tridimensionais da DNA topoisomerase II- $\alpha$  humana e na DNA topoisomerase II da levedura *S. cerevisiae*, que são as únicas outras estruturas resolvidas e disponíveis dessa enzima em eucariotos, também não apresentam essas alças na composição de seus homodímeros (BERGER et al., 1996; DONG; BERGER, 2007; WENDORFF et al., 2012).

Porém optamos por manter as regiões de “alça” na estrutura da proteína AeTop2, pois os parâmetros obtidos ao longo das etapas de validação do modelo foram considerados satisfatórios e, além disso, essas regiões não interferirem nos estudos de *docking* rígido, etapa final das análises estruturais *in silico* deste trabalho.

Quanto à distribuição de cargas elétricas, algumas das principais alterações observadas no modelo ocorrem na conformação das regiões de alças já mencionadas e na região que conecta as regiões de DNA *gate* “G” e *gate* “C” (figura 19). É importante notar que nestas regiões estão localizados os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio de dimerização da proteína. Curiosamente, mesmo no alinhamento múltiplo (figura 12), podemos notar que as DNA topoisomerasas II de insetos e humana apresentam diferenças consideráveis na composição de aminoácidos nos sítios de dimerização.

Após construção e validação do modelo da enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* realizamos o estudo de *docking* molecular com o inibidor etoposídeo. A análise do *redocking* contribuiu para o estabelecimento dos parâmetros para utilização no *docking* e foram consideradas satisfatórias e adequadas, segundo recomendado por Rodrigues e colaboradores (2012). Assim obtivemos *scores* de 95,61 e 60,70 para as cadeias A e B respectivamente, para a melhor interação prevista por *docking* do etoposídeo com a proteína AeTop2 (figura 20; quadro 6). As interações do inibidor com os resíduos de aminoácidos da enzima ocorrem por meio de ligações de hidrogênio e interações do tipo Van der Waals, e  $\pi$ -alquil (figura 21; quadro 7). Em geral verificamos um número comparável de interações entre o inibidor e os resíduos de aminoácidos nas proteínas do molde e modelo, o que sugere que a enzima de *Ae. aegypti* é sensível à ação inibitória do etoposídeo.

No *docking*, apesar da cadeia A do modelo da AeTop2 compartilhar um número maior de interações homólogas com a enzima molde, a melhor pose do etoposídeo para esta cadeia especificamente não correspondeu à orientação observada no cristal e no *redocking* do molde 3QX3 (figuras 22 e 23). Sugerimos que a ocorrência desta pose se deu possivelmente por pequenas mudanças conformacionais que ocorreram durante o refinamento da estrutura da proteína, uma vez que ocasionalmente, durante as etapas de minimização de energia para melhorar os ângulos diedros de alguns aminoácidos alocados em regiões não permitidas, estes podem sofrer pequenas mudanças



conformacionais. Conseqüentemente estes fatores podem ter promovido uma pose que difere da original no *docking* na cadeia A do molde.

A única pose de interação do etoposídeo com a cadeia A do modelo refinado obtida com a orientação “esperada” apresentou o valor de *score* (75,70) consideravelmente inferior ao melhor *score* obtido (95,61) (figura 23- C). Essa pose foi considerada insatisfatória, já que essa orientação invertida está presente em somente uma entre as dez melhores poses geradas e é apenas a quinta em valor absoluto de *score*.

Consideramos somente as interações presentes nas poses com melhor *score* em cada cadeia para analisar o *docking* molecular do etoposídeo com o modelo construído. Em termos mais comparativos, as interações obtidas no *docking* foram mais bem observadas em um alinhamento dos resíduos em posições homólogas das enzimas DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti*, das duas isoformas humanas e de *Drosophila melanogaster* (quadro 8), onde podemos notar algumas substituições em posições com resíduos importantes para a interação enzima-inibidor. Por exemplo, um resíduo de metionina conservado na Top II- $\beta$  humana (Met 787), na Top II- $\alpha$  humana (Met 766) e na Top II de *D. melanogaster* (Met 746) é substituído por uma glicina (Gly 768) no modelo AeTop2. Do ponto de vista bioquímico-estrutural, tal substituição confere mudanças características no volume da cadeia lateral, partindo de um aminoácido mais volumoso e apolar, como a metionina, para um menos volumoso e neutro, representado pela glicina. Uma mudança desse tipo tem o potencial de impactar nas interações da proteína com inibidores como o etoposídeo. E portando nos permite sugerir a possibilidade para desenhar inibidores seletivos específicos para proteína desde inseto.

Em outro exemplo, um resíduo de glutamina (Gln 764) presente na enzima de *Ae. aegypti* é conservado na Top II- $\beta$  humana (Gln 783), enquanto na isoforma Top II- $\alpha$  humana ocorre a substituição desse resíduo por uma metionina (Met 762). A presença do resíduo de glutamina nesta posição na proteína do mosquito possivelmente confere uma maior resistência ao etoposídeo. Um estudo com isolados naturais do nematódeo *Caenorhabditis elegans* demonstrou que, para essa mesma posição, a substituição do resíduo de glutamina por metionina na enzima DNA topoisomerase II torna estes animais mais sensíveis ao etoposídeo, uma vez que este aminoácido compõe o sítio de clivagem e religação do DNA pela enzima (ZDRALJEVIC et al., 2017). Além disso, os isolados de nematódeos mais sensíveis ao inibidor apresentam maiores danos genômicos e atraso no

desenvolvimento (ZDRALJEVIC et al., 2017). Assim, a natureza hidrofóbica do resíduo de metionina (Met 762) na isoforma Top II- $\alpha$  humana parece conferir maior estabilidade na interação com o etoposídeo, se comparada ao resíduo de glutamina ocupando essa mesma posição na isoforma Top II- $\beta$ . A presença da glutamina nessa posição, como ocorre no caso do *Ae. aegypti* parece gerar animais providos de certo grau resistência ao etoposídeo. Curiosamente, outro mosquito vetor de grande importância em saúde pública, o *Anopheles gambiae*, apresenta um resíduo de metionina nessa posição (Met 741; acesso NCBI nº XP\_319665), de forma que futuramente seria interessante comparar as duas linhagens de mosquitos com relação à sensibilidade ao etoposídeo e a outros inibidores da atividade da DNA topoisomerase II.

Embora apresente o resíduo de glutamina na posição 764, ainda assim o estudo de *docking* molecular conseguiu realizar a predição das interações entre o inibidor etoposídeo e a enzima DNA topoisomerase II no mosquito *Ae. aegypti*, confirmando o potencial do etoposídeo para uso em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Após a abordagem *in silico*, que teve como objetivo identificar e caracterizar a estrutura da DNA topoisomerase II do *Ae. aegypti* e sua interação com inibidor foi verificado o perfil da expressão relativa do gene da AeTop2 nos diferentes estágios de desenvolvimento do mosquito por RT-qPCR (figura 24). Verificamos que os níveis de expressão do gene nos estágios de ovo e nas fases larvais sofrem pequenas variações, provavelmente não significativas. Contudo, mesmo não apresentando diferença estatística nessa análise, a fase de pupa apresentou uma menor abundância relativa do RNA da DNA topoisomerase II (figura 24).

É provável que a menor expressão gênica de AeTop2 na fase de pupa se deva ao fato de que os eventos mitóticos nesse estágio estejam reduzidos em relação às fases anteriores, pois nessa fase os eventos de diferenciação celular são mais atuantes do que os eventos de divisão celulares propriamente ditos. É descrito na literatura que um aumento na proliferação celular em insetos geralmente antecede a fase de pupa, uma vez que o epitélio intestinal formado durante os instares larvais passa por um processo de remodelamento completo na fase pré-pupa, envolvendo a destruição das células antigas por meio de eventos autofágicos e apoptóticos (NICOLSON; DENTON; KUMAR, 2015). Assim, uma intensa proliferação e diferenciação das células-tronco ocorrem no último estágio larval, dado origem a um novo epitélio intestinal, que é mantido no estágio de

pupa dos insetos (TETTAMANTI et al., 2007). Em *Ae. aegypti* as divisões das células-tronco ou de células regenerativas podem ser detectadas principalmente no 4º estágio larval (48 horas após a ecdise), representado uma preparação para a diferenciação de novas células do intestino do adulto durante a fase de pupa (RAY et al., 2009; FERNANDES et al., 2014). Interessantemente alguns constataram uma ausência ou escassez de células regenerativas intestinais em divisão no estágio de pupa em abelhas (CRUZ-LANDIM; CAVALCANTE, 2003; MARTINS et al., 2006), indicando que a diminuição das divisões celulares no estágio de pupa não é característica exclusiva dos insetos dípteros. A observação de uma redução na proliferação celular durante o estágio de pupa em insetos é compatível com perfil de expressão do mRNA de *AeTop2* observado para larvas L4 em relação ao estágio de pupa, uma vez que ação da enzima DNA topoisomerase II é fundamental para o desenlace dos cromossomos que precede a divisão mitótica.

Em relação ao perfil de expressão gênica da enzima na fase adulta, procurou-se comparar a expressão entre fêmeas alimentadas com sacarose e com sangue, para verificar a influência do repasto sanguíneo nos níveis da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* (figura 25- A). Observamos que os níveis de expressão do mRNA da *AeTop2* foram significativamente maiores em fêmeas alimentadas com sangue. É possível que os maiores níveis de expressão do mRNA sejam causados pela intensa atividade da enzima em eventos mitóticos, principalmente no ovário, devido a sua maturação, proliferação das células nutridoras e foliculares, conseqüentemente na produção de ovos após o repasto sanguíneo, visto que as proteínas do sangue promovem a maturação dos ovários e o desenvolvimento total dos ovos em até 72 horas após o repasto de sanguíneo (REY, 2001; FORATTINI, 2002).

Para entender melhor o aumento da expressão gênica da DNA topoisomerase II observado nas fêmeas após alimentação sanguínea, investigamos o perfil de expressão de seu mRNA nos órgãos de fêmeas de *Ae. aegypti* (figura 25- B). Além dos ovários, investigamos a expressão do mRNA da *AeTop2* no intestino e corpo gorduroso do mosquito. O intestino foi selecionado pelo papel que possui na digestão e na aquisição de nutrientes, enquanto o corpo gorduroso foi escolhido por sua função ativa na vitelogenese, que ocorre até 48 horas após o repasto sanguíneo (ATTARDO; HANSEN;

RAIKHEL, 2005). Observamos altos níveis de expressão do mRNA para a AeTop2 nos ovários, enquanto níveis de expressão significativamente menores foram observados no intestino e no corpo gorduroso. Este resultado confirmou que o ovário é o órgão responsável pelo aumento dos níveis de expressão gênica da enzima em resposta a condição nutricional.

Os níveis menores de expressão gênica do mRNA da DNA topoisomerase II encontrados no intestino e corpo gorduroso (figura 25- B), podem ser explicados por características morfofisiológicas inerentes a estes órgãos em cada etapa do ciclo de vida do mosquito. Em culicídeos, o desenvolvimento em número de células do corpo gorduroso ocorre ao longo das fases larvais e pupal (CLEMENTS, 1963). Na fase adulta dos mosquitos, os trofócitos (células do corpo gorduroso) são observados normalmente apenas aumentando de tamanho frente aos sinais nutricionais provenientes da dieta (HANSEN et al., 2004). Dessa forma é provável que a atividade de vitelogênese associada ao corpo gorduroso esteja associada apenas a um aumento no volume e no metabolismo dos trofócitos e não a sua proliferação, o que pode explicar a expressão baixa do mRNA da AeTop2 nesse estágio.

A menor expressão do mRNA da AeTop2 no intestino possivelmente ocorre como um efeito natural da dieta do mosquito, uma vez que epitélio intestinal médio de fêmeas de *Ae. aegypti* apresenta um menor número de células mitóticas após alimentação sanguínea em relação ao intestino de fêmeas alimentadas com sacarose (TARACENA et al., 2018). Essa redução na quantidade de células intestinais em divisão ocorre em resposta a mecanismos de estresse oxidativo causado pela ingestão de sangue (TARACENA et al., 2018). Assim a redução de células mitóticas no intestino médio após repasto sanguíneo implica em uma menor demanda pela ação enzimática da DNA topoisomerase II e se correlaciona com os níveis baixos observados para o mRNA dessa enzima.

O alto nível de expressão do mRNA da DNA topoisomerase II no ovário de fêmeas de *Ae. aegypti* era previsto, provavelmente ocorreu em resposta aos mecanismos fisiológicos acionados a alimentação sanguínea. Em mosquitos anautógenos, como no caso do *Ae. aegypti*, a ovogênese completa só o ocorre através da ingestão de um ou mais repastos sanguíneos (BRIEGEL; GUT; LEA, 2003), sendo a fase pré-oviposição

caracterizada pelo rápido aumento no tamanho dos ovários durante o crescimento vitelogênico (CHO; RAIKHEL, 2001).

A localização tecidual do mRNA da DNA topoisomerase II nos ovários e nos folículos/ovócitos isolados das fêmeas de *Ae. aegypti* através de hibridização *in situ* nos permitiu determinar como esse RNA se distribui ao longo do desenvolvimento dos ovócitos (figuras 26 e 27), possibilitando associar a proporção da marcação com os níveis de expressão relativa observados anteriormente. De forma sucinta, os ovários de fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* são do tipo meroístico politrófico, caracterizado pela presença de um grupo de células nutridoras encerradas no folículo que se formam e se deslocam junto com o ovócito, ao longo do vitelário (CHAPMAN, 1998). Em dípteros, as células foliculares primordiais estão inicialmente localizadas na base de cada ovaríolo, junto ao ovócito. Posteriormente, elas sofrem consecutivas mitoses e recobrem todo o conjunto “nutridora/ovócito”, formando o folículo em maturação (BASILE, 1969). Obtivemos uma marcação evidente e intensa nas regiões que correspondem às camadas de células epiteliais foliculares que circundam cada folículo primário, por todo o ovaríolo. A marcação fluorescente dos núcleos nas mesmas regiões reveladas pela sonda confirma a expressão do mRNA da *AeTop2* nas células epiteliais foliculares. Além disso, observamos que os folículos secundários e terciários também são marcados pela sonda.

Dentre os tecidos que apresentam especializações do ciclo celular, o ovário é um dos mais interessantes, pois é capaz de reunir diferentes cenários relacionados à replicação do DNA em um mesmo órgão. Nos ovários de dípteros ocorrem: (1) a divisão meiótica no ovócito, (2) eventos de poliploidia e politenia nas células nutridoras e (3) uma atividade mitótica intensa no conjunto de células epiteliais foliculares (BASILE, 1969). As células epiteliais foliculares são células somáticas e nos insetos participam da vitelogênese, promovendo a abertura de espaços que levam a exposição da superfície do ovócito à hemolinfa, processo que permite com que o ovócito capture precursores do vitelo por endocitose da hemolinfa, sendo que algumas espécies podem sintetizá-los. Elas também secretam o envelope vitelino para composição do córion (GILBERT; RAUNIO, 1997).

Na mosca *D. melanogaster* já foi visto que a enzima DNA topoisomerase II tem papel importante no desenvolvimento do ovário e dos ovócitos. A redução dos níveis de

expressão gênica da enzima, por RNAi, promove a esterilidade das fêmeas. Resultando em ovários com cromossomos apresentando falhas na segregação completa das suas regiões heterocromáticas durante a meiose I (HUGHES; HAWLEY, 2014).

Neste sentido sugerimos que a ação da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* é imprescindível aos mecanismos que envolvem a dinâmica do ciclo celular nas células foliculares, nutridoras e do ovócito propriamente dito, uma vez que a proliferação ativa e a funcionalidade dessas células garantem a viabilidade do ovo e o desempenho na oviposição.

Ao fim da ovogênese, entre 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo, o epitélio folicular desaparece, deixando os ovócitos em contato direto com oviduto para serem fecundados (CONSOLI et al., 1983). Assim, a expressão observada por RT-qPCR nos ovos de 5 dias se refere ao embrião desenvolvido “quiescente”, não havendo correspondência com o epitélio folicular, já descartado.

Nos ensaios de decatenação do kDNA *in vitro*, o extrato de proteínas nucleares das células do mosquito *Ae. aegypti* (Aag2) promoveram a liberação dos minicírculos a partir da rede de kDNA (figura 42), evidenciando a presença de uma DNA topoisomerase II ativa no núcleo dessas células. Além disso, a ação catalítica da enzima só ocorre na presença do ATP (figura 43), que atua como um cofator enzimático dessa classe de enzimas. Sendo foi possível observar a inibição parcial do substrato da atividade de decatenação do kDNA na presença do inibidor etoposídeo nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$ , enquanto as concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$  inibiram totalmente ação catalítica da DNA topoisomerase II (figura 44). A decatenação do kDNA demonstrada para extratos de proteínas nucleares das células Aag2 ocorreu de forma muito semelhante aos ensaios do gênero descrito por especialistas no volume “*DNA Topoisomerase Protocols, II: Enzymology and Drugs*” (OSHEROFF; BJORNSTI, 2001). Dessa forma o inibidor confirma a predição das análises estruturais do *docking in silico* propostas no estudo de modelagem por homologia do presente trabalho.

Para avaliação dos efeitos inibitórios na função da DNA topoisomerase II em mosquitos *Ae. aegypti* verificamos a toxicidade *in vivo* do inibidor etoposídeo (VP-16-213) nos estágios larvais mantidos em laboratório (figura 19). Nesse contexto, nossos testes de

atividade larvicida confirmaram os efeitos da toxicidade do inibidor sobre a sobrevivência das larvas, demonstrando um efeito tempo e dose dependente apresentado nas curvas de sobrevivência (gráfico de Kaplan-Meier), para concentrações crescentes do inibidor (figura 29- A), sendo tanto a mortalidade em relação ao controle quanto o efeito de dose estatisticamente significativos. Curiosamente, a ação do inibidor da DNA topoisomerase II não provoca mortalidade imediata em larvas do 2º instar e a sobrevivência das larvas começa a ser visivelmente afetada apenas a partir do 7º dia de observação. Em todos os tratamentos, a sobrevivência das larvas dos grupos tratados permanece em níveis superiores a 40%, não sendo possível estimar o LC<sub>50</sub> absoluto nessas condições (tabela 1). Entretanto, apesar da mortalidade não atingir níveis altos nesse bioensaio, a viabilidade das larvas é claramente comprometida pelo tratamento, notado também pela menor formação do número de pupas (figura 29- B) e outros fatores discutidos adiante.

As primeiras alterações observadas nas larvas de *Ae. aegypti* após o tratamento com o etoposídeo foram na redução da mobilidade larval e no processo de muda normal, reações não observadas no grupo controle. De acordo com outros ensaios que evidenciaram o potencial larvicida de alguns extratos vegetais, óleos essenciais ou compostos variados, a redução dos movimentos larvais é o um dos primeiros e principais indícios da atividade larvicida de um determinado produto (RUIZ et al., 2004). Neste sentido, a motilidade larval vem sendo utilizada como indicador de toxicidade em alguns estudos. Arruda, Oliveira e Silva (2003) mostraram que larvas de *Ae. aegypti* tratadas com extrato de *Magonia pubescens* tiveram redução significativa dos movimentos. Em outro estudo, tratamentos com os óleos essenciais combinados de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, *Carapa guianensis* e o extrato fermentado de *Carica papaya* conferiram menor motilidade em larvas de *Ae. aegypti* de 3º estágio (TORRES et al., 2014). A letargia larval também foi observada nas larvas de *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles albimanus* quando expostas à toxina Cry11Bb, proveniente do *Bacillus thuringiensis israelensis* (RUIZ et al., 2004).

Além da participação do sistema nervoso e da atuação de enzimas digestivas, os processos de muda envolvem os movimentos corporais da larva. É a partir da motilidade contínua que as larvas recebem estímulos ambientais que contribuem para a ruptura da cutícula e promoção da muda adequada. Neste contexto, um agente capaz de atuar no

sistema nervoso ou modificar o exoesqueleto, comprometendo a atividade locomotora e as mudas, pode representar um larvicida potencial para insetos vetores, como no caso do *Ae. aegypti* (BRAGA; VALLE, 2007b).

A inspeção visual de larvas tratadas com diferentes doses de etoposídeo permitiu a observação dos impactos desse inibidor sobre a morfologia e o desenvolvimento larval após oito dias de tratamento. De um modo geral, conforme a concentração do inibidor aumenta de 50 até 100  $\mu\text{M}$ , percebemos um aumento na quantidade de larvas menores, com aspecto encolhido e com pigmentação corporal em tons mais claros ou transparentes (figura 30), sugerindo um retardo no desenvolvimento larval. Um atraso semelhante no desenvolvimento larval ocorreu quando as larvas de *Ae. aegypti* foram tratadas com o larvicida comercial diflubenzuron, quando foram observadas larvas com tamanho menor que o esperado e aspectos morfológicos alterados, que foram relacionados ao acúmulo de mudas incompletas (BORGES et al., 2004). A toxicidade do etoposídeo já foi demonstrada para outros modelos invertebrados, como para o nematóide *Caenorhabditis elegans*, em que esse inibidor reduz significativamente o crescimento e interfere com a postura e a eclosão dos ovos, além de afetar o tecido da gônada reprodutiva, promovendo a redução do número de células germinativas (LEE et al., 2017).

Apesar de ocorrer um padrão de clareamento geral das larvas conforme a concentração do etoposídeo aumenta, uma análise mais detalhada das larvas tratadas revela que há um escurecimento localizado em algumas estruturas anatômicas nas larvas tratadas com 50 e 100  $\mu\text{M}$  do inibidor (figura 31-D; E; F; G; H e I). A alteração morfofisiológica que leva a maior pigmentação do intestino médio e posterior nesses tratamentos pode estar relacionada a diferentes fatores, uma vez que nos insetos o intestino é o principal alvo de substâncias tóxicas (VALOTTO et al., 2011), podendo ser um indicador importante para avaliar se um composto possui atividade citotóxica. Diversos mecanismos podem estar envolvidos no escurecimento dos intestinos médio e posterior, como por exemplo, a melanização causada pela cascata de fenoloxidase (SHAO et al., 2012), que pode ser ativada por diversos fatores, como infecções e danos teciduais (SILVA; GARY; RAU, 2000; SHAO et al., 2012).

As larvas destes mesmos tratamentos (50 e 100  $\mu\text{M}$ : figura 31-F e I) também apresentaram um material escuro depositado na estrutura das brânquias do lóbulo anal,



com características morfológicas semelhantes à deposição de matriz peritrófica como resposta a danos por toxicidade. A extrusão da matriz peritrófica com o conteúdo intestinal como efeito da toxicidade de substâncias já foi descrita, por exemplo, em estudos com taninos isolados e extratos de *Magonia pubescens* (timbó) (VALOTTO et al., 1762; ARRUDA; OLIVEIRA; DA SILVA, 2003). O perfil morfológico observado nesses estudos é semelhante ao que é identificado em nossas observações, sendo possível que se trate de um mecanismo fisiológico similar. Uma vez que todos os eventos morfogenéticos dependem de proliferação e diferenciação

É possível que parte das larvas observadas após 8 dias de tratamento na concentração de 200  $\mu\text{M}$  de etoposídeo tenham sido retidas no 2º estágio do desenvolvimento larval ou ainda, que essas larvas tenham realizado sucessivas mudas sem passar pelo desenvolvimento morfológico correspondente, justificando o fenótipo pouco desenvolvido e a manutenção da transparência corporal (figura 31 e 32: 200  $\mu\text{M}$ ). O efeito inibitório do etoposídeo sobre a progressão do ciclo celular pode estar associado a uma redução acentuada da proliferação celular e, conseqüentemente, ao retardo do desenvolvimento das larvas de *Ae. aegypti*. Em relação às alterações morfológicas apresentadas no tórax das larvas desse mesmo tratamento (figura 31-J; K; L e M), descritas aqui como manchas escuras, é necessária uma investigação mais detalhada dessa característica para entender melhor sua ocorrência e seu significado fisiopatológico.

A inibição da enzima DNA topoisomerase II também promoveu alterações morfofisiológicas na metamorfose das pupas que, como padrão geral observado em todos os tratamentos, não foram capazes de realizar o dobramento dos segmentos corporais para assumirem o formato característico em vírgula (figura 32), o que impossibilitou a flutuação das pupas na superfície da água e a emergência dos mosquitos adultos. É possível que a proliferação celular reduzida nos estágios anteriores possa ter impedido o desenvolvimento de estruturas que levassem ao dobramento correto dos segmentos para atingir o formato característico de vírgula (FORATTINI, 2002).

A pigmentação escura observada nas pupas derivadas das larvas submetidas ao tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo poderia ser interpretada como um processo natural da muda (figura 32-C), já que as pupas sofrem escurecimento à medida que se aproxima

da metamorfose em adulto, característica descrita como uma coloração enegrecida pontual do cefalotórax (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Porém, como essa coloração escura se difundia por todo segmento ventral e dorsal, passamos a caracterizar tal alteração morfológica, assim como o rompimento incompleto do cefalotórax observado para o tratamento com 200  $\mu\text{M}$  do inibidor (figura 32-D), como efeitos da toxicidade causados pela inibição da DNA topoisomerase II.

Todo o conjunto de dados envolvendo a mortalidade e as alterações morfofisiológicas das formas larvais e das pupas expostas ao etoposídeo pode ser atribuído aos efeitos desse inibidor na proliferação celular. Após a eclosão há um rápido crescimento das partes anatômicas que serão contidas pelo enrijecimento da quitina (quitinização), compreendendo a cápsula cefálica e o sifão respiratório, enquanto as partes mais moles crescem mais lentamente e de forma contínua. O corpo gorduroso, o tecido nervoso e as gônadas crescem por aumento do número de células, enquanto o crescimento dos tecidos das papilas anais, túbulos de Malpighi e glândulas salivares se dão principalmente pelo aumento do volume de suas células (CLEMENTS, 1963). Assim, qualquer interferência com as ações da enzima DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* poderá comprometer, ao menos em parte, os eventos que promovem divisões celulares nas sucessivas mudas ao longo dos estágios larvais e, conseqüentemente, causar danos as formas larvais e impedir a formação adequada do mosquito adulto durante a metamorfose. Uma vez que todos os eventos morfogenéticos dependem de proliferação e diferenciação celular, a formação de estruturas cuticulares vai depender do “cardápio” correto de proteínas sintetizadas pelas células da cutícula, que possivelmente também tem sua capacidade replicativa reduzida pela ação do etoposídeo.

Dessa forma, para dar continuidade à caracterização funcional da enzima DNA topoisomerase II, realizamos uma série de ensaios *in vitro*, onde analisamos os efeitos do etoposídeo sobre células de *Ae. aegypti* mantidas em cultura.

Encontram-se descritas na literatura algumas linhagens celulares estabelecidas de *Ae. aegypti* que são usadas no estudo de diversos aspectos da biologia celular desse vetor (SINGH, 1967; PELEG, 1968; MOHAMED et al., 2018). Dentre as linhagens utilizadas, uma das mais amplamente empregadas corresponde às células Aag2, originadas de células embrionárias imortalizadas de *Ae. aegypti* (PELEG, 1968). A

linhagem Aag2 foi escolhida para investigarmos, a nível celular, a importância da enzima DNA topoisomerase II e sua inibição pelo etoposídeo.

Nas duas abordagens experimentais empregadas para avaliação da viabilidade celular, os efeitos do inibidor foram dose-resposta e tempo dependente. Sendo capaz de reduzir a capacidade proliferativa das células, confirmada pelo ensaio de cristal violeta (figura 34), em nossas análises o pós testes de detecção de tendências mostraram que a inclinação das curvas aumentaram progressivamente, de -0,1323 em 24 horas até -0,2547 em 96 horas, acentuando o efeito da dose em função do tempo de exposição. As curvas de sobrevivência (24 e 48 horas) do ensaio do MTT também reproduziram sensibilidade dose-dependente das células Aag2 ao inibidor etoposídeo (figura 33), com valores de  $IC_{50}$  médios de 121,45  $\mu\text{M}$  (24 horas) e 64,78  $\mu\text{M}$  (48 horas) (tabela 2). De forma que um maior período de exposição requer uma concentração efetiva menor para reduzir a viabilidade celular.

É importante mencionar que os valores de  $IC_{50}$  determinados para as células Aag2 mantiveram-se na ordem de  $\mu\text{M}$ , de forma semelhante a que ocorre em outros tipos celulares e estão relativamente próximos aos descritos para diversas linhagens celulares tumorais. Por exemplo, um estudo mostrou que células BGC-823 (derivadas de tumor gastrointestinal humano), HeLa (tumor cervical humano), HepG2 (tumor hepático humano) e A549 (tumor de pulmão humano) apresentaram valores de  $IC_{50}$  de 43, 74, 209, 90, 30, 16 e 139,54  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em 48 horas (XIAO et al., 2014). Outro estudo relatou valores de 16, 10 e 4,3  $\mu\text{M}$  em 48 horas de tratamento com etoposídeo para as linhagens A549, DLD-1 (derivada de tumor colorretal humano) e WS-1 (derivada de fibroblastos de pele humana sadia) (QIU et al., 2019). Já fibroblastos de camundongo da linhagem 3T3-L1 apresentaram  $IC_{50}$  de 37,8 e 9,8  $\mu\text{M}$  em 24 e 48 horas de tratamento com etoposídeo, respectivamente (LEE et al., 2017). Até onde foi possível verificar, trata-se da primeira descrição de valores de  $IC_{50}$  para tratamento com etoposídeo em uma linhagem celular de animais invertebrados e, em particular, de um artrópode vetor de doença, o *Aedes aegypti*.

Conforme visto no item 1.2.11, o etoposídeo atua na estabilização dos complexos de clivagem formados entre o DNA e a enzima topoisomerase II, os Top2ccs, levando a não religação das quebras de fita dupla (DSBs) nas cadeias do DNA. A inibição da função

da DNA topoisomerase II, juntamente com o acúmulo de DSBs, pode levar ao bloqueio do ciclo celular e à morte (NITISS; BECK, 1996; MORIMOTO et al., 2019) por apoptose. A DNA topoisomerase II assume vários papéis em diversos processos celulares, induzindo o relaxamento do DNA, evitando sua superhelicoidização ou convertendo em formas concatenadas (entrelaçadas ou interconectadas) em formas decatenadas (separadas) (VOLOGODSKII; RYBENKOV, 2009; RAMPKAKIS et al., 2010). A decatenação do DNA consiste em uma função exercida exclusivamente pelas topoisomerasas do tipo II, enquanto as ações de relaxamento podem ser também exercidas pelas DNA topoisomerasas do tipo I (Champoux, 2001). Portanto, a determinação *in vitro* da DNA topoisomerase II de *Ae. aegypti* como alvo do etoposídeo envolveu um ensaio específico que avaliou a inibição da capacidade de decatenação pela DNA topoisomerase II.

O comprometimento da viabilidade celular e a indução da morte por apoptose frente ao tratamento com etoposídeo são fenômenos muito bem estabelecidos em muitos tumores e modelos celulares derivados de mamíferos, como fibroblastos 3T3 e linhagens tumorais (STÄHELIN, 1973; HANDE, 1998; LEE et al., 2017, QIU et al., 2019). Já em modelos celulares provenientes de animais invertebrados, os fenômenos induzidos por etoposídeo foram bem menos explorados. Alguns estudos evidenciaram que o etoposídeo atua como um indutor de morte celular por apoptose em células de insetos. Por exemplo, estudos na linhagem celular S2 de *Drosophila melanogaster* (POLTRONIERI et al., 1997) e na linhagem celular Sf9 do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (HAMBARDE; SINGH; CHANDNA, 2013) descrevem que essas células, quando expostas ao etoposídeo, exibem alterações bioquímicas e morfológicas típicas de células apoptóticas, caracterizando-o como um controle positivo efetivo da indução desse tipo de morte celular programada em insetos.

Em animais, a morte celular pode ocorrer por vias diversas, como necrose, apoptose, morte celular autofágica e também por catástrofe mitótica, entre outras (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Para caracterização da morte celular sofrida pelas células Aag2 durante o tratamento com etoposídeo são necessárias outras análises além da viabilidade celular, uma vez que os diferentes tipos de morte celular são definidos por critérios morfológicos (DUPREZ et al., 2009) e bioquímicos (WALKER et al., 1988). Assim o presente trabalho procurou avaliar as características morfológicas das células

Aag2 em resposta da inibição da enzima DNA topoisomerase II. Os resultados da histoquímica com hematoxilina-eosina (HE) mostraram que a dinâmica de proliferação celular foi drasticamente afetada pelo etoposídeo durante 48 e 96 horas de exposição (figuras 36 e 37), sustentando os dados da proliferação e viabilidade discutidos anteriormente. A menor capacidade de divisão das células pode ser atribuída à redução das junções celulares, que contribuem para a formação das monocamadas de células. A diminuição das junções celulares é evidenciada por uma retração citoplasmática crescente, dando as células um formato arredondado e bem menor em relação aos controles, sugerindo um efeito dose-dependente (figuras 36 e 37). Possivelmente, as alterações morfológicas observadas se deram devido ao bloqueio na progressão do ciclo celular, caracterizando as alterações típicas que acompanham um cenário com morte celular.

Quando observadas sobre microscopia óptica de fluorescência, as células Aag2 tratadas com etoposídeo apresentaram núcleos bem menores e com indícios de fragmentação já em 24 horas nos tratamentos com 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  do inibidor (figura 38-A: 24 horas). Com o aumento do tempo de exposição ao inibidor as células passam a apresentar núcleos picnóticos e marginalizados em relação à área citoplasmática. As alterações morfológicas observadas nos núcleos são compatíveis com a ocorrência de morte celular por apoptose, que envolve condensação da cromatina e do nucleoplasma, seguida da fragmentação nuclear (WALKER et al., 1988). Além disso, tanto na microscopia óptica de contraste de fase, quanto na coloração com HE às células Aag2 tratadas se tornam mais “arredondadas” e com formato irregular, uma morfologia muito semelhante a aquela apresentada por células Sf9 incubadas com 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo durante 24 horas (HAMBARDE; SINGH; CHANDNA, 2013). Como esperado, os efeitos do etoposídeo sobre a morfologia celular e nuclear são mais acentuados nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , como observado tanto na análise de histoquímica, quanto na microscopia de contraste de fase e no perfil de fluorescência dos núcleos (figuras 38: 48 72 e 96 horas). Possivelmente, as alterações na morfologia destas células se deram devido a dois fatores: o acúmulo de quebras em dupla fita no DNA (DSBs), que podem causar desde uma parada na progressão do ciclo celular até a morte por apoptose, e o não desenlace das cromátides irmãs durante a mitose, que pode promover uma parada do ciclo durante a divisão celular e o disparo da morte pela via da catástrofe mitótica (VITALE et al., 2011;

MC GEE, 2015), hipótese que poderia ser melhor comprovada através de estudo citogenético e análise do cariótipo dessas células.

Após a observação das alterações morfológicas, a morte por apoptose foi estimada com uma análise por eletroforese do DNA genômico das células Aag2 expostas ao etoposídeo, onde a fragmentação internucleossômica do DNA foi observada em todas as concentrações e tempos de tratamento com o inibidor (figura 39). Bioquimicamente, existe uma clivagem enzimática do DNA internucleossomal distinta e característica da morte por apoptose, que é bem diferente da degradação aleatória do DNA observada na morte celular por necrose (WALKER et al., 1988), sendo possível identificar o perfil característico de fragmentos de DNA múltiplos de 200 pb neste ensaio. Essa técnica de detecção de apoptose foi muito empregada na determinação de morte celular fisiológica em culturas de células de insetos (CLEM; FECHHEIMER; MILLER, 1991; PRIKHOD'KO et al., 1999), constituído uma ferramenta auxiliar para avaliação e caracterização da apoptose.

As análises da marcação, em caráter qualitativo, das células com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) após exposição ao etoposídeo, complementam experimentalmente os dados de alterações morfológicas e fragmentação internucleossomal do DNA. Através da avaliação dos danos à permeabilidade de membrana e da exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, é possível inferir os estágios iniciais e avançados da apoptose em intervalos de tempo menores (6, 18, 24, 48 horas) (figura 40) , auxiliando na melhor compreensão dos diferentes estágios da apoptose e da dinâmica da progressão do ciclo celular nas células do mosquito submetidas à inibição da atividade da DNA topoisomerase II. Além disso, foi feita uma análise do ciclo celular por citometria de fluxo das populações de células Aag2 tratadas com etoposídeo. Análise que permitiu distinguir e quantificar a proporção de células em cada etapa do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M), assim como aponta a presença de corpos apoptóticos (figura 41).

O etoposídeo é capaz de induzir o bloqueio do ciclo celular e promover a morte por apoptose (STÄHELIN, 1973). Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o etoposídeo é mais citotóxico quando atua sobre células na fase S tardia, período da síntese do DNA, ou início da fase G2, na interfase pré-mitótica, sendo caracterizado como um inibidor citotóxico de fase

específica, promovendo quebras de fitas duplas de DNA, com ação dose dependente (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018). Assim as maiores concentrações do inibidor (50 e 100  $\mu\text{M}$ ), exibiram cenários com parte da população de células em apoptose já nas primeiras 6 horas do teste, identificadas pela marcação positiva da Anexina-V e PI (figura 41- A). Já nos experimentos de avaliação do ciclo celular com citometria de fluxo observamos que, enquanto a concentração de 50  $\mu\text{M}$  do inibidor promove a redução de células na fase G0/G1 no ciclo celular, a de 100  $\mu\text{M}$  induz o acúmulo de células na população G0/G1 no mesmo período de incubação (figura 41- A: 6 horas), sugerindo um bloqueio do ciclo celular no ponto de checagem que ocorre ao final da fase G1 do ciclo celular.

E em concentrações menores do inibidor (1 e 10  $\mu\text{M}$ ), parte das células assume um perfil compatível com a apoptose somente em 18 horas de ensaio, identificadas pela marcação positiva da anexina-V (figura 41- B). Nos experimentos de citometria de fluxo, notamos que o etoposídeo a 10  $\mu\text{M}$  promove um decréscimo acentuado da população de células em G0/G1 em 6 horas de exposição, com esgotamento total dessa população já em 48 horas de ensaio (figura 42- A: 48 horas). Assim sugerimos que uma grande proporção das células tratadas com 10 e 50  $\mu\text{M}$  do inibidor consegue passar pelo ponto de checagem da fase G1, mas sofre um bloqueio em G2/M, um fenômeno mais claramente visível nas populações expostas a 10  $\mu\text{M}$  do inibidor. Este bloqueio em G2/M se mantém até 48 horas, em conjunto com eventos de apoptose avançada observados na marcação com Anexina-V e PI para esse tempo (figura 41- D).

Em 24 horas de ensaio com Anexina-V e PI, uma grande proporção das células do tratamento de 1  $\mu\text{M}$  expõe fosfatidilserina no folheto externo de suas membranas e apresenta algum comprometimento à permeabilidade de membrana, o que é compatível com o disparo da morte por apoptose. Já as células expostas a 10  $\mu\text{M}$  de etoposídeo parecem expor a fosfatidilserina em suas membranas, mas não apresentam danos significativos à permeabilidade de membrana (figura 41- C). Apesar de não termos esta observação para os experimentos de citometria de fluxo nesta concentração, notamos aqui que as células aparentemente apresentam uma sensibilidade considerável a uma dose 10 vezes menor do inibidor.

Nos experimentos de citometria de fluxo (figura 41-B e C), observamos que grande parte das células expostas a 10  $\mu$ M do inibidor (e em alguma extensão para as expostas a 50  $\mu$ M) escapam do bloqueio S/G2/M e geram uma nova população de células em aparente tetraploidia, que é observada na forma de um terceiro pico nos histogramas. O aparecimento de células apresentando tetraploidia pode estar relacionado ao estabelecimento de um processo de endoreplicação ou a uma etapa do processo de morte celular por catástrofe mitótica. O processo de endoreplicação é conhecido por dar origem a células com cópias extras dos cromossomos por meio de repetidos ciclos replicativos, resultando em poliploidia, politenia ou amplificação (FOX; DURONIO, 2013). Consistindo num desvio do ciclo celular canônico, com reinício da replicação do DNA mais de uma vez por ciclo celular. Na endoreplicação, o acúmulo de DNA na célula resulta de períodos alternados das fases S e G2/G1, não completando ou até mesmo não iniciando a mitose (EDGAR; ORR-WEAVER, 2001). Em dípteros, como *Drosophila melanogaster* a politenia ocorre na maioria dos tecidos e poliploidia em alguns (NORDMAN; ORR-WEAVER, 2012). Em *D. melanogaster* os níveis de ploidia em células diferenciadas podem variar de 16C a 1024C (RODMAN, 1967).

As células Aag2 são de origem embrionária e aparentemente apresentam um perfil basal de tetraploidia em condições normais (8C) (figura 41-A, B e C: histogramas controle), observado como um pico discreto na amostra controle da análise do ciclo celular. Porém o tratamento com 10  $\mu$ M de etoposídeo promove a intensificação desse processo. Os eventos de endoreplicação podem estar relacionados a condições anormais de proliferação celular, devido à rigidez do controle da replicação e divisão celular, o que contribui para instabilidade genômica e cenários patológicos na célula (DAVOLI; DE LANGE, 2001).

Segundo Fox e Duronio (2013), a conversão de um ciclo mitótico num ciclo endoreplicativo depende da supressão da divisão celular e da manutenção da atividade dos complexos ciclina/CDK, oscilando em níveis baixos e altos, para que o material genético seja reduplicado na ausência de divisão celular. O que corresponderia ao cenário observado principalmente nos tratamentos com 10  $\mu$ M de etoposídeo.

A catástrofe mitótica é outro fenômeno já descrito que pode explicar a tetraploidia observada nos experimentos de citometria de fluxo. A catástrofe mitótica é um processo



fisiológico de morte celular decorrente de falhas ou interferências com a segregação dos cromossomos durante a divisão mitótica e importante por prevenir desfechos que leve à instabilidade genômica (VITALE et al., 2011; MC GEE, 2015). A catástrofe mitótica pode ser definida como um mecanismo celular que detecta falhas na execução da mitose e encaminha a célula para a morte celular ou para um estado de senescência, evitando assim que células filhas possam assumir um estado oncogênico. Durante a catástrofe mitótica as células passam por uma parada ou bloqueio do ciclo celular na fase M, que pode levar diretamente a morte celular ou ainda ao reingresso na fase G1, com comprometimento para a morte celular ou para a entrada em senescência (VITALE et al., 2011; MC GEE, 2015). Durante esse processo, as células que reingressam em G1 podem apresentar um estado poliplóide, sendo que uma proporção dessas células poliplóides pode gerar células descendentes viáveis (ERENPREISA et al., 2005). Dentre os agentes químicos que podem promover a catástrofe mitótica está a doxorubicina que, assim como etoposídeo, é um inibidor da atividade da DNA topoisomerase II (EOM et al., 2005). Curiosamente, em um modelo de células tumorais hepáticas humanas, a doxorubicina induz a morte celular por catástrofe mitótica somente quando administrada em pequenas doses, enquanto doses maiores induzem a morte celular pela via apoptótica convencional (EOM et al., 2005). Essa forma de atuação se assemelha ao que observamos nos ensaios de citometria de fluxo para células Aag2 tratadas com concentrações menores e maiores de etoposídeo. Nesse cenário, o não desenlace cromossômico causado pela inibição da DNA topoisomerase II seria responsável pela parada na progressão do ciclo durante a mitose e as células nesse estado corresponderiam ao pico em G2/M observado na concentração de 10  $\mu$ M de etoposídeo (figura 42). Além disso, o pico tetraploide observado nessa mesma concentração seria derivado de uma proporção de células tetraplóides que passaram da fase M e conseguiram replicar seu genoma.

Diferentemente do que ocorre nas concentrações inferiores no ensaio de citometria de fluxo, a concentração de 100  $\mu$ M não favorece aumento dos níveis de tetraploidia e também conduz a um cenário inicial com grande acúmulo de células em G0/G1 (figura 42-C), com uma população bastante reduzida de células nas fases S/G2/M. Notamos que parte dessas células morreram com o aumento das horas de exposição ao etoposídeo, com níveis de apoptose crescentes a partir de 18 horas e dominando os histogramas nos intervalos de tempo subsequentes. Esses dados refletem a apoptose em estágios

avançados com acentuada internalização de PI e exposição de fosfatidilserina em 48 horas de ensaio (figura 40-D), assim como a fragmentação internucleossomal de DNA, também observada nesse mesmo intervalo.

Considerando os dados em conjunto, as diferentes concentrações do inibidor levam as células tratadas a diferentes desfechos. Isso pode ocorrer devido a diferentes níveis de inibição da atividade enzimática da DNA topoisomerase II, produzindo assim danos no DNA em menor e maior intensidade e também interferindo com fenômenos celulares como replicação, transcrição e mitose de forma diferenciada. Para as concentrações menores de etoposídeo (exemplo: 10  $\mu\text{M}$ ), sugerimos que o inibidor não promova a formação de um grande número quebras de fita dupla (DSBs) que as demais concentrações do ensaio (50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Assim, sugerimos que o mecanismo de ação do etoposídeo nas concentrações menores se deva a inibição da atividade de decatenação das cromátides irmãs, promovendo uma parada do ciclo nos pontos de checagem ao final de G2 ou em M, sem estimular diretamente o processo convencional de morte celular por apoptose. Entretanto, mesmo sem a ocorrência de apoptose, a proliferação celular é comprometida em grau considerável. Já para concentrações maiores de etoposídeo (exemplo: 100  $\mu\text{M}$ ) irão ocorrer danos ao DNA, na forma de DSBs, em grandes quantidades e que irão conduzir a alterações mais drásticas e imediatas na progressão do ciclo celular.

A resposta de uma célula aos danos no DNA depende tanto da natureza e da magnitude das lesões quanto à sua posição exata do ciclo celular. Um estudo de vídeo microscopia com lapso de tempo (*time lapse microscopy*) foi observado, em células humanas em cultura, que danos no DNA desencadeiam paradas na progressão do ciclo celular que vão depender da fase do ciclo em que as células foram tratadas (CHAO et al., 2017). Assim, uma interpretação para os dados obtidos por citometria de fluxo seria que danos de DSBs em menor quantidade, produzidos pela dose de 10  $\mu\text{M}$  de etoposídeo, não seriam suficientes para parar as células durante o ponto de checagem no final de G1, promovendo a parada do ciclo apenas no ponto de checagem na transição G2/M ou no ponto de checagem que ocorre durante a metáfase da mitose. Por outro lado, uma maior proporção de danos DSBs, provocada pela concentração de 100  $\mu\text{M}$  de etoposídeo,

provocaria uma parada no ponto de checagem ao final de G1, impedindo a entrada em S e promovendo a morte celular por apoptose.

O trabalho apresenta a primeira descrição de uma enzima do tipo DNA topoisomerase em *Ae. aegypti*, incluindo a análise dos efeitos do inibidor clássico etoposídeo sobre o mosquito e sobre a linhagem celular Aag2. Curiosamente, podemos encontrar na literatura algumas publicações que mostram a susceptibilidade de *Ae. aegypti* a produtos naturais que contêm, entre seus constituintes, inibidores da atividade da DNA topoisomerase II e que, portanto, apontam essa enzima como um bom alvo para o desenvolvimento de inibidores com atividade mosquitocida e larvicida. Para fins de exemplo, o composto (3-n-butil-4,5-dihidroftalideo) isolado no extrato das sementes de *Apium graveolens* L. (salsão), com atividade inibitória para DNA topoisomerase I e II de *S. cerevisiae* na concentração de 100 µg/mL, também foi capaz de exibir 100% da mortalidade em larvas do 4º estágio de *Ae. aegypti* durante 24 horas de exposição, em uma concentração de 25 µg/mL (MOMIN; RAMSEWAK; NAIR, 2000).

Por fim, em conjunto os dados descritos experimentalmente nesse trabalho fornecem os primeiros indicativos do em termos estruturais e funcionais da enzima DNA topoisomerase II do vetor *Ae. aegypti*, um modelo de grande importância na saúde pública. A caracterização da interação do inibidor etoposídeo e a enzima *AeTop2 in silico* no estudo de ancoramento molecular permitiu a identificação de singularidades estruturais que abrem possibilidades para o desenvolvimento de inibidores seletivos, de forma que tanto *in vivo* e *in vitro* os efeitos do inibidor demonstraram uma ação pleiotrópica, afetando múltiplos processos que dependem de divisão celular.

## 6. CONCLUSÕES

- O mosquito *Ae. aegypti* possui um único gene que codifica a enzima DNA topoisomerase II (*AeTop2*) e que compartilha 76% de similaridade com seu ortólogo em *D. melanogaster* e cerca de 65% de similaridade com seus ortólogos em *Homo sapiens*. *AeTop2* apresenta conservados os domínios GyrA e GyrB, assim como os principais motivos funcionais característicos dessas enzimas.
- Evolutivamente o gene da *AeTop2* diverge juntamente com os ortólogos de artrópodes e em um clado separado do que engloba as isoformas alfa e beta de cordados.
- Foi construído, otimizado e validado um modelo da enzima *AeTop2*. Nos estudos de *docking* molecular com o inibidor etoposídeo, foi observado que o modelo compartilha muitas interações homólogas às realizadas no molde (topoisomerase II- $\beta$  de *H. sapiens*).
- A identificação de singularidades nas substituições de aminoácidos na estrutura do modelo da proteína *AeTop2* fornece informações para desenvolvimento de inibidores seletivos.
- O mRNA de *AeTop2* é expresso em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*.
- A dieta sanguínea contribui para os maiores níveis de expressão do mRNA de *AeTop2* em fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*.
- Nas fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* alimentadas com sangue, os ovários são o órgão com maior nível de expressão do mRNA de *AeTop2*.
- Nos ovários das fêmeas de *Ae. aegypti*, o mRNA da enzima *AeTop2* é enriquecendo especialmente nas células foliculares ao longo de todo ovário nas câmaras ovocíticas.

- Os extratos de proteínas nucleares das células Aag2 apresentaram atividade de decatenação do kDNA *in vitro* dependente de ATP.
- A atividade de decatenação do kDNA dos extratos nucleares de Aag2 foi inibida pelo etoposídeo de forma parcial com doses de 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$  e de forma total com doses acima de 100  $\mu\text{M}$ .
- A exposição *in vivo* ao inibidor etoposídeo promove atraso no desenvolvimento, mortalidade e alterações morfológicas nas larvas de *Ae. aegypti*.
- A inibição da atividade da enzima DNA topoisomerase II reduz a sobrevivência e viabilidade das células Aag2, com efeitos sobre a proliferação celular e indução de morfologia semelhante à apoptótica.
- O etoposídeo é capaz de induzir a morte celular por apoptose em células Aag2, indicada pela fragmentação internucleossômica do DNA, pela exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática e por danos à permeabilidade de membrana.
- Diferentes concentrações de etoposídeo promovem diferentes perfis de ciclo celular ao longo do tempo em células Aag2. Em particular: (I) Em concentrações menores (10  $\mu\text{M}$ ), o etoposídeo parece promover a parada do ciclo celular ao final de G2/M e (II) em doses superiores (100  $\mu\text{M}$ ), o etoposídeo promove efeitos mais drásticos, com a parada do ciclo celular no ponto de checagem ao final de G1 e indução massiva de morte celular.
- A intensificação de um estado de tetraploidia é observada nas células Aag2 na menor dose de exposição do inibidor (10  $\mu\text{M}$ ), possivelmente como resposta de falhas na segregação cromossômica e a eventual ocorrência de catástrofe mitótica ou endoreplicação genômica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEE, N.L.; GRIECO, J.P.; VATANDOOST, H.; SEIXAS, G.; PINTO, J.; CHING-NG, L.; MARTINS, A.J.; JUNTARAJUMNONG, W.; CORBEL, V.; GOUAGNA, C.; DAVID, J.P.; LOGAN, J.G.; ORSBORNE, J.; MAROIS, E.; DEVINE, G.J.; VONTAS, J. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 13, n. 1, a. e0006822. 2019.

ACOSTA-AMPUDIA, Y.; MONSALVE, D.M.; RODRÍGUEZ, Y.; PACHECO, Y.; ANAYA, J.M.; RAMÍREZ-SANTANA, C. Mayaro: an emerging viral threat? **Emerg. Microbes Infect.** v. 7, n. 1, a. 163. 2018.

ADELMAN, Z.N.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A.A. Development and applications of transgenesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 121, n. 1, p. 1-10. 2002.

AKIMITSU, N.; ADACHI, N.; HIRAI, H.; HOSSAIN, M.S.; HAMAMOTO, H.; KOBAYASHI, M.; ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; SEKIMIZU, K. Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase II $\alpha$ . **Genes Cells** v. 8, n. 4, p. 393-402. 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2017. 1464 p.

ALI, M.; AFZAL, M.; ABDUL NASIM, S.; AHMAD, I. Nanocurcumin: a novel antifilarial agent with DNA topoisomerase II inhibitory activity. **J. Drug Target.** v. 22, n. 5, p. 395-407. 2014.

ANDERSON, H.J.; ROBERGE, M. DNA topoisomerase II: a review of its involvement in chromosome structure, DNA replication, transcription and mitosis. **Cell Biol. Int. Rep.** v. 16, n. 8, p. 717-724. 1992.

ANDREADIS, T.C.; HALL, D.W. Relationship between physiological age and fecundity in *Culex salinarius* (Diptera: Culicidae). **Med. Entomol.** v. 17, p. 485-486. 1980.

APPLIED BIOSYSTEMS. **User Bulletin # 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System**, 2001. 36 p. Acessível em <[http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_040980.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_040980.pdf)>. Acesso em: 05 mar. 2020.

ARDUINO, M.B.; MARQUES, G.R.A.M.; SERPA, L.L.N. Registro de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em recipientes com água salina em condições naturais. **BEPA. Bol. Epidemiol. Paul.** v. 7, n. 83, p. 22-28. 2010.

ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G.; WYLLIE, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. **Am. J. Pathol.** v. 136, n. 3, p. 593-608. 1990.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.; DA SILVA, I.G. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 1, p. 17-25. 2003.

ATTARDO, G.M.; HANSEN, I.A.; RAIKHEL, A.S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** v. 35, n. 7, p. 661-675. 2005.

ATYAME, C.M.; LABBÉ, P.; LEBON, C.; MYLÈNE WEILL, M.; MORETTI, R.; MARINI, F.; GOUAGNA, L.C.; CALVITTI, M.; TORTOSA, P. Comparison of irradiation and *Wolbachia* based

approaches for sterile-male strategies targeting *Aedes albopictus*. **PLoS One**, v. 11, n. 1, a. e0146834. 2016.

AUPARAKKITANON, S.; WILAIRAT, P. Cleavage of DNA induced by 9-anilinoacridine inhibitors of topoisomerase II in malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 269, n. 2, p. 406-409. 2000.

AUSTIN, C.A.; LEE, K.C.; SWAN, R.L.; KHAZEEM, M.M.; MANVILLE, C.M.; CRIDLAND, P.; TREUMANN, A.; PORTER, A.; MORRIS, N.J.; COWELL, I.G. TOP2B: The First Thirty Years. **Int. J. Mol. Sci.** v. 19, n. 9, a. e2765. 2018.

AUSTIN, C.A.; MARSH, K.L.; WASSERMAN, R.A.; WILLMORE, E.; SAYER, P.J.; WANG, J.C.; FISHER, L.M. Expression, domain structure, and enzymatic properties of an active recombinant human DNA topoisomerase II $\beta$ . **J. Biol. Chem.** v. 270, n. 26, p. 15739-15746. 1995.

AUSTIN, C.A.; SNG, J.H.; PATEL, S.; FISHER, L.M. Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1172, n. 3, p. 283-291.1993.

AZEVEDO, R.S.S.; OLIVEIRA, C.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Chikungunya risk for Brazil. **Rev. Saúde Pública** v. 49, a. e58. 2015.

BAKER, N.M.; RAJAN, R.; MONDRAGÓN, A. Structural studies of type I topoisomerases. **Nucleic Acids Res.** v. 37, n. 3, p. 693-701. 2009.

BALDACCHINO, F.; CAPUTO, B.; CHANDRE, F.; DRAGO, A.; DELLA TORRE, A.; MONTARSI, F.; RIZZOLI, A. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. **Pest Manag. Sci.** v. 71, n. 11, p.1471-1485. 2015.

BANDELE, O.J.; OSHEROFF, N. The efficacy of topoisomerase II-targeted anticancer agents reflects the persistence of drug-induced cleavage complexes in cells. **Biochemistry** v. 47, n. 45, 11900-11908. 2008.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; BASTOS, F.I.; XIMENES, R.A.A.; BARATA, R.B.; RODRIGUES, L.C. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet** v. 377, n. 9780, p. 1877-1889. 2011.

BARRETT, A.D.T. The reemergence of yellow fever. **Science** v. 361, n. 6405, p. 847-848. 2018.

BASILE, R. Nucleic acid synthesis in nurse cells of *Rhynchosciara angelae* (Nonato and Pavan, 1951). **Genetics** v. 61, suppl.1, p. 261-273. 1969.

BATES, A.D.; BERGER, J.M.; MAXWELL, A. The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. **Nucleic Acids Res.** v. 39, n. 15, p. 6327-6339. 2011.

BATES, A.D.; MAXWELL, A. DNA topology: topoisomerases keep it simple. **Curr. Biol.** v. 7, n. 12, p. r778-781. 1997.

BELLINI, R.; MEDICI, A.; PUGGIOLI, A.; BALESTRINO, F.; CARRIERI, M. Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. **J. Med. Entomol.** v. 50, n. 2, p. 317-325. 2013.

BERGER, J.M.; FASS, D.; WANG, J.C.; HARRISON, S.C. Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95, n. 14, p. 7876-7881. 1998.

BERGER, J.M.; GAMBLIN, S.J.; HARRISON, S.C.; WANG, J.C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. **Nature** v. 379, n. 6562, p. 225-232. 1996.

BERGERAT, A.; DE MASSY, B.; GADELLE, D.; VAROUTAS, P.C.; NICOLAS, U.M.; FORTERRE, P. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. **Nature** v. 386, n. 6623, p. 414-417. 1997.

BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A.W.; MOYES, C.L.; DRAKE, J.M.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; SANKOH, O.; MYERS, M.F.; GEORGE, D.B.; JAENISCH, T.; WINT, G.R.; SIMMONS, C.P.; SCOTT, T.W.; FARRAR, J.J.; HAY, S.I. The global distribution and burden of dengue. **Nature** v. 496, n. 7446, p. 504-507. 2013.

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathog.** v. 6, n. 4, a. e1000833. 2010.

BJORNSTI, M.A.; KAUFMANN, S.H. Topoisomerases and cancer chemotherapy: recent advances and unanswered questions. **F1000 Res.** v.8, F1000 Faculty Rev., a.1704. 2019.

BLOMME, T.; VANDEPOELE, K.; DE BODT, S.; SIMILLION, C.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution. **Genome Biol.** v. 7, n. 5, a. r43. 2006.

BORGES, R.A.; CAVASIN, G.M.; SILVA, I.G.; ARRUDA, W.; OLIVEIRA, E.S.F.; SILVA, H.H.G.; MARTINS, F. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev. Patol. Trop.** v. 33, p. 91-104. 2004

BRACCO, J.E.; CAPURRO, M.L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SALLUM, M.A. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 102, n. 5, p. 573-580. 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254. 1976.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde** v. 16, n. 4, p. 279-293. 2007b.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde** v. 16, n. 4, p. 295-302. 2007a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela**: risco se aproxima e Ministério alerta para a vacinação, 2018a. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/44661-febre-amarela-risco-se-aproxima-e-ministerio-alerta-para-a-vacinacao>>. Acesso em: 04 de mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre do Mayaro**: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção, 2019. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro>>. Acesso em: 04 de mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue**: instruções para pessoal de combate ao vetor - Manual de normas técnicas. 3. ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2001. 84 p. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man\\_dengue.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf)>. Acesso em: 04 mar. 2020.



BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico.** 3. ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2002. 28p. Disponível em: <[http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/hotsite/dengue/arquivos/dengue\\_manejo\\_clinico.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/hotsite/dengue/arquivos/dengue_manejo_clinico.pdf)>. Acesso em: 04 Mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Imunizações: 30 anos.** Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2003. 298 p. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro\\_30\\_anos\\_pni.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro_30_anos_pni.pdf)>. Acesso em: 04 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose.** 2. ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2008. 195 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos; Cadernos de Atenção Básica, n. 21). Disponível em: <[http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/cadernos\\_ab/abcd21.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcd21.pdf)>. Acesso em: 04 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica.** 7 ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2009a. 816 p. (Série A. Normas e manuais técnicos). Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_7ed.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf)>. Acesso em: 04 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue.** 1.ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2009b. 160 p. (Série A. Normas e manuais técnicos). Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf)>. Acesso em: 04 mar.2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2015. **Bol. Epidemiol.** v. 47, n. 3. 2016. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 43 de 2018. **Bol. Epidemiol.** v. 49, n. 48. 2018b. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

BRIEGEL, H.; GUT, T.; LEA, A.O. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Insect. Physiol.** v. 49, n. 3, p. 249-260. 2003.

BRUNTON, L.L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman** 13. ed. Porto Alegre (RS): Artmed/McGraw-Hill (AMGH), 1760 p. 2018.

BUCHMAN, A.; GAMEZ, S.; LI, M.; ANTOSHECHKIN, I.; LI, H.H.; WANG, H.W.; CHEN, C.H.; KLEIN, M.J.; DUCHEMIN, J.B.; PARADKAR, P.N.; AKBARI, O.S. Engineered resistance to Zika virus in transgenic *Aedes aegypti* expressing a polycistronic cluster of synthetic small RNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 116, n. 9, p. 3656-3661. 2019.

BURRI, C.; BODLEY, A.L.; SHAPIRO, T.A. Topoisomerases in kinetoplastids **Parasitol. Today** v. 12, n. 6, p. 226-231. 1996.

BURT, A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. **Proc. Biol. Sci.** v. 270, n. 1518, p. 921-928. 2003.

CALVO, E.; TOKUMASU, F.; MARINOTTI, O.; VILLEVAL, J.L.; RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.** v. 282, n. 37, p. 26928-26938. 2007.

CAMPOS, G.S.; BANDEIRA, A.C.; SARDI, S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v. 21, n. 10, p. 1885-1886. 2015.

CAVALCANTI, D.P.; GONÇALVES, D.L.; COSTA, L.T.; DE SOUZA, W. The structure of the kinetoplast DNA network of *Crithidia fasciculata* revealed by atomic force microscopy. **Micron** v. 42, n. 6, p. 553-559. 2011.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. of Microbiol.** v. 44, p. 649-688. 1990.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.** v. 70, p. 369-413. 2001.

CHAO, H.X.; POOVEY, C.E.; PRIVETTE, A.A.; GRANT, G.D.; CHAO, H.Y.; COOK, J.G.; PURVIS, J.E. Orchestration of DNA damage checkpoint dynamics across the human cell cycle. **Cell Syst.** v. 5, n. 5, p. 445-459. 2017.

CHAPMAM, R.F. **The insects: Structure and function.** 5. ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 2012. 959 p.

CHAVALITSHEWINKOON, P.; WILAIRAT, P.; GAMAGE, S.; DENNY, W.; FIGGITT, D.; RALPH, R. Structure-activity relationships and mode of action of 9-anilino acridines against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 37, n. 3, p. 403-406. 1993.

CHEESMAN, S.; MCALEESE, S.; GOMAN, M.; JOHNSON, D.; HORROCKS, P.; RIDLEY, R.G.; KILBEY, B.J. The gene encoding topoisomerase II from *Plasmodium falciparum*. **Nucleic Acids Res.** v. 22, n. 13, p. 2547-2551. 1994.

CHEESMAN, S.J. The topoisomerases of protozoan parasites. **Parasitol. Today** v. 16, n. 7, p. 277-281. 2000.

CHEN, X.G.; MATHUR, G.; JAMES, A.A. Gene expression studies in mosquitoes. **Adv. Genet.** v. 64, p. 19-50. 2008.

CHIPPAUX, J.P.; CHIPPAUX, A. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** v. 24, a. 20. 2018.

CHO, K.H.; RAIKHEL, A.S. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. **Insect. Mol. Biol.** v. 10, n. 5, p. 465-474. 2001.

CHRISTIE, M.; CHANG, C.W.; RÓNA, G.; SMITH, K.M.; STEWART, A.G.; TAKEDA, A.A.; FONTES, M.R.; STEWART, M.; VÉRTESSY, B.G.; FORWOOD, J.K.; KOBE, B. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. **J. Mol. Biol.** v. 428, n. 10 (pt. A), p. 2060-2090. 2016.

- CHRISTOPHERS, S.R. ***Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito**: its life history, bionomics and structure. 1. ed. Londres (UK): Cambridge University Press, 1960. 739 p.
- CLEM, R.J.; FECHHEIMER, M.; MILLER, L.K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science** v. 254, n. 5036, p. 1388-1390. 1991.
- CLEMENTS, A.N. **The biology of mosquitoes**: development, nutrition, and reproduction (vol 1). 1. ed. Londres (UK): Chapman & Hall, 1992. 509 p.
- CLEMENTS, A.N. **The physiology of mosquitoes**: international series of monographs on pure and applied biology. 1. ed. Nova York (NY, USA): The Macmillan Company, 1963. 393 p.
- COLLINS, I.; WEBER, A.; LEVENS, D. Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. **Mol. Cell. Biol.** v. 21, n. 24, p. 8437-8451. 2001.
- CONSOLI, R.A.G.B. Longevidade dos adultos de *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) quando submetidos a diversas dietas de carboidratos e de sangue (Diptera: Culicidae). **Rev. Brasil. Biol.** v. 42, p. 303-303. 1982.
- CONSOLI, R.A.G.B.; WILLIAMS, P. Aspects of the biology of laboratory - reared female *Aedes fluviatilis*. **Mosquito News** v. 41, p. 30-36. 1981.
- CONSOLI, R.A.G.B.; WILLIAMS, P.; MORENO, E.C.; SANTOS, B.S. Features of reproduction in laboratory-reared *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 78, n. 1, p. 37-47. 1983.
- CONSOLI, R.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro (RJ): Fiocruz, 1994. 228 p.
- COOK, P.R. The organization of replication and transcription. **Science** v. 284, n. 5421, p. 1790-1795. 1999.
- CORBETT, K.D.; BERGER, J.M. Emerging roles for plant topoisomerase VI. **Chem Biol.** v. 10, n. 2, p. 107-111. 2003.
- COZZARELLI, N.R. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. **Science** v. 207, n. 4434, p. 953-960. 1980.
- CRUZ-LANDIM, C.; CAVALCANTE, V.M. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). **Zoolog. Sci.** v. 20, n. 9, p. 1099-1107. 2003.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; HUANG, X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. **Curr. Protoc. Immunol.** v. 60, n. 1, p. 5.7.1-5.7.18. 2004.
- DAS, A.; DASGUPTA, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H.K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends Parasitol.** v. 20, n. 8, p. 381-387. 2004.
- D'ATANASIO, N.; CAPEZZONE DE JOANNON, A.; DI SANTE, L.; MANGANO, G.; OMBRATO, R.; VITIELLO, M.; BARTELLA, C.; MAGARÒ, G.; PRATI, F.; MILANESE, C.; VIGNAROLI, C.; DI GIORGIO, F.P.; TONGIANI, S. Antibacterial activity of novel dual bacterial DNA type II topoisomerase inhibitors. **PLoS One** v. 15, n. 2, a. e0228509. 2020.
- DAVOLI, T.; DE LANGE, T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 27, p.585-610. 2011.

DE CAMPOS NEBEL, M.; PALMITELLI, M.; GONZÁLEZ-CID, M. Measurement of drug-stabilized topoisomerase II cleavage complexes by flow cytometry. **Curr. Protoc. Cytom.** v. 81, p. 7.48.1-7.48.8. 2017.

DEHAL, P.; BOORE, J.L. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. **PLoS Biol.** v. 3, n. 10, a. e314. 2005.

DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 46, n. 5, p. 509-520. 1952.

DINGWALL, C.; LASKEY, R.A. Nuclear targeting sequences - a consensus? **Trends Biochem. Sci.** v. 16, n. 12, p. 478-481. 1991.

DISSANAYAKE, S.N.; RIBEIRO, J.M.; WANG, M.H.; DUNN, W.A.; YAN, G.; JAMES, A.A.; MARINOTTI, O. aeGEPUCI: a database of gene expression in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC Res. Notes** v. 3, a. 248. 2010.

DONG, K.C.; BERGER, J.M. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. **Nature** v. 450, n. 7173, p. 1201-1205. 2007.

DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes Infect.** v. 11, n. 13, p. 1050-1062. 2009.

DURAND-DUBIEF, M.; PERSSON, J.; NORMAN, U.; HARTSUIKER, E.; EKWALL, K. Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression *in vivo*. **EMBO J.** v. 29, n. 13, p. 2126-2134. 2010.

DUTTA, R.; INOUE, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. **Trends Biochem. Sci.** v. 25, n. 1, p. 24-28. 2000.

EDGAR, B.A.; ORR-WEAVER, T.L. Endoreplication cell cycles: more for less. **Cell** v. 105, n. 3, p. 297-306. 2001.

EDMAN, J.D.; STRICKMAN, D.; KITTAYAPONG, P.; SCOTT, T.W. Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. **J. Med. Entomol.** v. 29, p. 1035-1038. 1992.

EOM, Y.W.; KIM, M.A.; PARK, S.S.; GOO, M.J.; KWON, H.J.; SOHN, S.; KIM, W.H.; YOON, G.; CHOI, K.S. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. **Oncogene** v. 24, n. 30, p. 4765-4777. 2005.

ERENPREISA, J.; KALEJS, M.; IANZINI, F.; KOSMACEK, E.A.; MACKEY, M.A.; EMZINSH, D.; CRAGG, M.S.; IVANOV, A.; ILLIDGE, T.M. Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe. **Cell Biol. Int.** v. 29, n. 12, p. 1005-1011. 2005.

FARIA, N.R.; KRAEMER, M.U.G.; HILL, S.C.; GOES DE JESUS, J.; AGUIAR, R.S.; IANI, F.C.M.; XAVIER, J.; QUICK, J.; DU PLESSIS, L.; DELLICOUR, S.; THÉZÉ, J.; CARVALHO, R.D.O.; BAELE, G.; WU, C.H.; SILVEIRA, P.P.; ARRUDA, M.B.; PEREIRA, M.A.; PEREIRA, G.C.; LOURENÇO, J.; OBOLSKI, U.; ABADE, L.; VASYLYEVA, T.I.; GIOVANETTI, M.; YI, D.; WEISS, D.J.; WINT, G.R.W.; SHEARER, F.M.; FUNK, S.; NIKOLAY, B.; FONSECA, V.; ADELINO, T.E.R.; OLIVEIRA, M.A.A.; SILVA, M.V.F.; SACCHETTO, L.; FIGUEIREDO, P.O.; REZENDE, I.M.; MELLO, E.M.; SAID, R.F.C.; SANTOS, D.A.; FERRAZ, M.L.; BRITO, M.G.; SANTANA, L.F.; MENEZES, M.T.; BRINDEIRO, R.M.; TANURI, A.; DOS SANTOS, F.C.P.; CUNHA, M.S.;

NOGUEIRA, J.S.; ROCCO, I.M.; DA COSTA, A.C.; KOMNINAKIS, S.C.V.; AZEVEDO, V.; CHIEPPE, A.O.; ARAUJO, E.S.M.; MENDONÇA, M.C.L.; DOS SANTOS, C.C.; DOS SANTOS, C.D.; MARES-GUIA, A.M.; NOGUEIRA, R.M.R.; SEQUEIRA, P.C.; ABREU, R.G.; GARCIA, M.H.O.; ABREU, A.L.; OKUMOTO, O.; KROON, E.G.; DE ALBUQUERQUE, C.F.C.; LEWANDOWSKI, K.; PULLAN, S.T.; CARROLL, M.; DE OLIVEIRA, T.; SABINO, E.C.; SOUZA, R.P.; SUCHARD, M.A.; LEMEY, P.; TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P.; FILIPPIS, A.M.B.; LOMAN, N.J.; CAUCHEMEZ, S.; ALCANTARA, L.C.J.; PYBUS, O.G. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science** v. 361, n. 6405, p. 894-899. 2018.

FARNESI, L.C.; MARTINS, A.J.; VALLE D.; REZENDE, G.L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 104, n. 1, p. 124-126. 2009.

FEINBERG, H.; LIMA, C.D.; MONDRAGÓN, A. Conformational changes in *E. coli* DNA topoisomerase I. **Nature Struct. Biol.** v. 6, n. 10, p. 918-922. 1999.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harb. Protoc.** v. 2016, n. 4, p. 343-346. 2016.

FERNANDES, K.M.; NEVES, C.A.; SERRÃO, J.E.; MARTINS, G.F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. **Parasitol. Int.** v. 63, n. 3, p. 506-512. 2014.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica vol. 2:** Identificação, biologia e epidemiologia. 1. ed. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo (EdUSP), 2002. 864 p.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica:** parte geral, Diptera, Anophelini (vol. 1). 1. ed. São Paulo (SP): Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1962. 662 p.

FORTUNE, J.M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** v. 64, p. 221-253. 2000.

FOX, D.T.; DURONIO, R.J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. **Development** v. 140, n. 1, p. 3-12. 2013.

FRANZ, A.W.; SANCHEZ-VARGAS, I.; ADELMAN, Z.N.; BLAIR, C.D.; BEATY, B.J.; JAMES, A.A.; OLSON, K.E. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 103, n. 11, p. 4198-4203. 2006.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis** v. 11, n. 4, p. 315-325. 1996.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; MONTGOMERY, JR., J.A.; VREVEN, T.; KUDIN, K.N.; BURANT, J.C.; MILLAM, J.M.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G.A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J.E.; HRATCHIAN, H.P.; CROSS, J.B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R.E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; AYALA, P.Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; ZAKRZEWSKI, V.G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A.D.; STRAIN, M.C.; FARKAS, O.; MALICK, D.K.; RABUCK, A.D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CUI, Q.; BABOUL, A.G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B.B.; LIU, G.;

LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R.L.; FOX, D.J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M.A.; PENG, C.Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P.M.W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M.W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J.A. **Gaussian 03**, revision C.02. Gaussian, Inc., Wallingford (CT, USA), 2004. Disponível em: <<https://gaussian.com/>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

FU, S.; XIAO, S.H. Pyronaridine: a new antimalarial drug. **Parasitol. Today** v. 7, n. 11, p. 310-313. 1991.

GANTZ, V.M.; JASINSKIENE, N.; TATARENKOVA, O.; FAZEKAS, A.; MACIAS, V.M.; BIER, E.; JAMES, A.A. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 112, n. 49, p. E6736-E6743. 2015.

GARCIA-BUSTOS, J.; HEITMAN, J.; HALL, M.N. Nuclear protein localization. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1071, n. 1, p. 83-101. 1991.

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M.H.; NASH, H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 73, n. 11, p. 3872-3876. 1976.

GILBERT, S.F.; RAUNIO, A.M. **Embryology: constructing the organism**. 1. ed. Sunderland (UK): Sinauer Associates, 1997. 537 p.

GÓMEZ-EICHELMANN, M.C.; CAMACHO-CARRANZA, R. Superenrolamento de DNA e topoisomerasas em *Escherichia coli*. **Rev. Latinoam. Microbiol.** v. 37, n. 3, p. 291-304. 1995.

GOTO, Y.; WANG, J.C. Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 82, n. 21, p. 7178-7182. 1985.

GUIMARÃES, A.E.; GENTILE, C.; LOPES, C.M.; SANT'ANNA, A. Ecologia de mosquitos em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina. II Frequência mensal e fatores climáticos. **Rev. Saúde Pública** v. 35, p. 392-399. 2001.

HALDANE, A.; SULLIVAN, D.M. DNA topoisomerase II-catalyzed DNA decatenation. **Methods Mol. Biol.** v. 95, p. 13-23. 2001.

HAMBARDE, S.; SINGH, V.; CHANDNA, S. Evidence for involvement of cytosolic thioredoxin peroxidase in the excessive resistance of Sf9 lepidopteran insect cells against radiation-induced apoptosis. **PLoS One** v. 8, n. 3, a. e58261. 2013.

HAMMOND, A.; GALIZI, R.; KYROU, K.; SIMONI, A.; SINISCALCHI, C.; KATSANOS, D.; GRIBBLE, M.; BAKER, D.; MAROIS, E.; RUSSELL, S.; BURT, A.; WINDBICHLER, N.; CRISANTI, A.; NOLAN, T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. **Nat. Biotechnol.** v. 34, n. 1, p. 78-83. 2016.

HANAI, R.; CARON, P.R.; WANG, J.C. Human TOP3: a single copy gene encoding DNA topoisomerase III. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 93, n. 8, p. 3653-3657. 1996.

HANDE, K.R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. **Eur. J. Cancer** v. 34, n. 10, p. 1514-1521. 1998.

- HANSEN, I.A.; ATTARDO, G.M.; PARK, J.H.; PENG, Q.; RAIKHEL, A.S. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 101, n. 29, p. 10626-10631. 2004.
- HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminform.** v. 4, n. 1, a. 17. 2012.
- HAYES, E.B. Zika virus outside Africa. **Emerg. Infect. Dis.** v. 15, n. 9, p. 1347-1350. 2009.
- HELINSKI, M.E.H.; PARKER, A.G.; KNOLS, B.G.J. Radiation biology of mosquitoes. **Malar. J.** v. 8, suppl. 2, a. S6. 2009.
- HEVENER, K.; VERSTAK, T.A.; LUTAT, K.E.; RIGGSBEE, D.L.; MOONEY, J.W. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. **Acta Pharm. Sin. B** v. 8, n. 6, p. 844-861. 2018.
- HOLM, C.; GOTO, T.; WANG, J.C.; BOTSTEIN, D. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. **Cell** v. 41, n. 2, p. 553-563. 1985.
- HOLMES, V.F.; COZZARELLI, N.R. Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. **Proc Natl. Acad. Sci. USA** v. 97, n. 4, p. 1322-1324. 2000.
- HORWOOD, P.F.; BUCHY, P. Chikungunya. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** v. 34, n. 2, p. 479-489. 2015.
- HUGHES, S.E.; HAWLEY, R.S. Topoisomerase II is required for the proper separation of heterochromatic regions during *Drosophila melanogaster* female meiosis. **PLoS Genet.** v. 10, n. 10, a. e1004650. 2014.
- JAVELLE, E.; GAUTRET, P.; RAOULT, D. Towards the risk of yellow fever transmission in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 21, n. 1, p. 10-12. 2018.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.** v. 267, n. 3, p. 727-748. 1997.
- JUHN, J.; JAMES, A.A. Hybridization *in situ* of salivary glands, ovaries, and embryos of vector mosquitoes. **J. Vis. Exp.** n. 64, a. 3709. 2012.
- JUHN, J.; JAMES, A.A. *Oskar* gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.** v. 15, n. 3, p. 363-372. 2006.
- KAUL, R.B.; EVANS, M.V.; MURDOCK, C.C.; DRAKE, J.M. Spatio-temporal spillover risk of yellow fever in Brazil. **Parasit. Vectors** v. 11, n. 1, a. 488. 2018.
- KELLY, J.M.; MCROBERT, L.; BAKER, D.A. Evidence on the chromosomal location of centromeric DNA in *Plasmodium falciparum* from etoposide-mediated topoisomerase-II cleavage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 103, n. 17, p. 6706-6711. 2006.
- KERR, J.F.R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M.; WATTERS, D. **Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis**. 1 ed. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 1-15. 331 p.
- KIM, R.A.; WANG, J.C. Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Mol. Biol.** v. 208, n. 2, p. 257-267. 1989.

- KING, A.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Family Togaviridae. In: **Virus Taxonomy**: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. 1. ed. Londres (UK): Elsevier Academic Press, p. 1103-1110. 1338. p. 2011.
- KNAUS, R.M.; FOIL, L.D.; ISSEL, C.J.; LEPRINCE, D.J. Insect blood meal studies using radiosodium  $^{24}\text{Na}$  and  $^{22}\text{Na}$ . **J. Am. Mosq. Control Assoc.** v. 9, p. 246-268. 1993.
- KOBAYASHI, M.; ADACHI, N.; KOYAMA, H. Characterization of the 3' untranslated region of mouse DNA topoisomerase II $\alpha$  mRNA. **Genev.** 215, n. 2, p. 329-337. 1998.
- KOLARIČ, A.; ANDERLUH, M.; MINOVSKI, N. Two decades of successful SAR-grounded stories of the novel bacterial topoisomerase inhibitors (NBTIs). **J. Med. Chem.** 17 de fevereiro (online). doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01738. 2020.
- KOTSAKIOZI, P.; GLORIA-SORIA, A.; CACCONI, A.; EVANS, B.; SCHAMA, R.; MARTINS, A.J.; POWELL, J.R. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 11, n. 7, a. e0005653. 2017.
- KRAEMER, M.U.; SINKA, M.E.; DUDA, K.A.; MYLNE, A.Q.; SHEARER, F.M.; BARKER, C.M.; MOORE, C.G.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E.; VAN BORTEL, W.; HENDRICKX, G.; SCHAFFNER, F.; ELYAZAR, I.R.; TENG, H.J.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; PIGOTT, D.M.; SCOTT, T.W.; SMITH, D.L.; WINT, G.R.; GOLDING, N. HAY, S.I. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife** v. 4, a. e08347. 2015.
- KRAH, R.; KOZYAVKIN, S.A.; SLESAREV, A.I.; GELLERT, M. A two subunit type I DNA topoisomerase (reverse gyrase) from an extreme hyperthermophile. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 93, n. 1, p. 106-110. 1996.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.** v. 87, n. 1, p. 99-163. 2007.
- KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal. Biochem.** v.182, n. 1, p. 16-19. 1989.
- KUMAR S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. *MEGA X*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Mol. Biol. Evol.** v. 35, n. 6, p. 1547-1549. 2018.
- LACOUR, G.; VERNICHON, F.; CADILHAC, N.; BOYER, S.; LAGNEAU, C.; HANCE, T. When mothers anticipate: Effects of the prediapause stage on embryo development time and of maternal photoperiod on eggs of a temperate and a tropical strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), **J. Insect Physiol.** v. 71, p. 87-96. 2014.
- LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallogr.** v. 26, n. 2, p. 283-291. 1993.
- LEA, A.O.; BRIEGEL, H.; LEA, H.M. Arrest, resorption or maturation of oocytes in *Aedes aegypti*: dependence on the quantity of blood and the interval between blood meals. **Physiol. Entomol.** v. 3, p. 309-316. 1978.
- LEE, J.H.; BERGER, J.M. Cell cycle-dependent control and roles of DNA topoisomerase II. **Genes (Basel)** v.10, n. 11, e859. 2019.



- LEE, S.Y.; KIM, J.Y.; JUNG, Y.J.; KANG, K. Toxicological evaluation of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in the model animal *Caenorhabditis elegans* and 3T3-L1 normal murine cells. **Environ. Toxicol.** v. 32, n. 6, p. 1836-1843. 2017.
- LIU, L.F.; WANG, J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 84, n. 20, p. 7024-7027. 1987.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  method. **Methods** v. 25, p. 402-408. 2001.
- LONG, B.H.; MUSIAL, S.T.; BRATTAIN, M.G. Single- and double-strand DNA breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide. **Cancer Res.** v. 45, n. 7, p. 3106-3112. 1985.
- LOTITO, L.; RUSSO, A.; CHILLEMI, G.; BUENO, S.; CAVALIERI, D.; CAPRANICO, G. Global transcription regulation by DNA topoisomerase I in exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation of telomere-proximal genes by TOP1 deletion. **J. Mol. Biol.** v. 377, n. 2, p. 311-322. 2008.
- LOVELL, S.C.; DAVIS, I.W.; ARENDALL, W.B.III; DE BAKKER, P.I.; WORD, J.M.; PRISANT, M.G.; RICHARDSON, J.S.; RICHARDSON, D.C. Structure validation by  $C\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and  $C\beta$  deviation. **Proteins Struct. Funct. Bioinform.** v. 50, n. 3, p. 437-450. 2003.
- LYU, Y.L.; WANG, J.C. Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase II $\beta$ . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 100, n. 12, p. 7123-7128. 2003.
- MAGALHÃES, R.C.S. **A erradicação do *Aedes aegypti*: febre amarela, Fred Soper e saúde pública nas Américas (1918-1968)**. 1. ed. Rio de Janeiro (RJ): FIOCRUZ, 2016. 420 p. (Coleção História e Saúde).
- MANNIGE, R.V.; KUNDU, J.; WHITELAM, S. The Ramachandran number: an order parameter for protein geometry. **Plos One** v. 11, n. 8, a. e0160023. 2016.
- MARTINS, G.F.; NEVES, C.A.; CAMPOS, L.A.; SERRÃO, J.E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron** v. 37, n. 2, p. 161-168. 2006.
- MC GEE, M.M. Targeting the mitotic catastrophe signaling pathway in cancer. **Mediators Inflamm.** v. 2015, a. e146282. 2015.
- MCBRIDE, W.J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections: pathogenesis and epidemiology. **Microbes Infect.** v. 2, n. 9, p. 1041-1050. 2000.
- MCCLENDON, A.K.; RODRIGUEZ, A.C.; OSHEROFF, N. Human topoisomerase II alpha rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. **J Biol Chem.** v. 280, n. 47, p. 39337-39345. 2005.
- MECZES, E.L.; MARSH, K.L.; FISHER, L.M.; ROGERS, M.P.; AUSTIN, C.A.; Complementation of temperature-sensitive topoisomerase II mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by a human TOP2 $\beta$  construct allows the study of topoisomerase II $\beta$  inhibitors in yeast. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 39, n. 4, p. 367-375. 1997.
- MESLIN, B.; BARNADAS, C.; BONI, V.; LATOUR, C.; DE MONBRISON, F.; KAISER, K.; PICOT, S. Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. **J. Infect. Dis.** v. 195, n. 12, p. 1852-1859. 2007.

- MINER, J.J.; DIAMOND, M.S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe*. v. 21, n. 2, p. 134-142. 2017.
- MIRSKI, S.E.; GERLACH, J.H.; COLE, S.P. Sequence determinants of nuclear localization in the alpha and beta isoforms of human topoisomerase II. *Exp. Cell Res.* v. 251, n. 2, p. 329-339. 1999.
- MOHAMED ALI, S.; AMROUN, A.; DE LAMBALLERIE, X.; NOUGAIREDE, A. Evolution of Chikungunya virus in mosquito cells. *Sci. Rep.* v. 8, n. 1, a. 16175. 2018.
- MOMIN, R.A.; RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G. Bioactive compounds and 1,3-di[(cis)-9-octadecenoyl]-2-[(cis,cis)-9,12-octadecadienoyl]glycerol from *Apium graveolens* L. seeds. *J. Agric. Food Chem.* v. 48, n. 9, p. 3785-3788. 2000.
- MOREIRA, L.A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J.A.; LU, G.; PYKE, A.T.; HEDGES, L.M.; ROCHA, B.C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L.E.; JOHNSON, K.N.; KAY, B.H.; MCGRAW, E.A.; VAN DEN HURK, A.F.; RYAN, P.A.; O'NEILL, S.L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1268-78.
- MORIMOTO, S.; TSUDA, M.; BUNCH, H.; SASANUMA, H.; AUSTIN, C.; TAKEDA, S. Type II DNA topoisomerases cause spontaneous double-strand breaks in genomic DNA. *Genes (Basel)* v. 10, n. 11, e868. 2019.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* v. 65, n. 1-2, p. 55-63. 1983.
- MOUSSON, L.; DAUGA, C.; GARRIGUES, T.; SCHAFFNER, F.; VAZEILLE, M.; FAILLOUX, A.B. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res.* v. 86, n. 1, p. 1-11. 2005.
- MUÑOZ, M.; NAVARRO, J.C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica* v. 32, n. 2, p. 288-302. 2012.
- MUSTAFA, M.S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control. *Med. J. Armed Forces India* v. 71, n. 1, p. 67-70. 2015.
- NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico* v. 64, n. 2, p. 205-207. 2002.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Nova York (NY, USA): Oxford University Press, 2000. 333 p.
- NEVIN, L.M.; XIAO, T.; STAUB, W.; BAIER, H. Topoisomerase II $\beta$  is required for lamina-specific targeting of retinal ganglion cell axons and dendrites. *Development* v. 138, n. 12, p. 2457-2465. 2011.
- NICHOLS, M.D.; DEANGELIS, K.; KECK, J.L.; BERGER, J.M. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J.* v. 18, n. 21, p. 6177-6188. 1999.
- NICOLSON, S.; DENTON, D.; KUMAR, S. Ecdysone-mediated programmed cell death in *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* v. 59, n. 1-3, p. 23-32. 2015.

NITISS, J.L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nat. Rev. Cancer** v. 9, n. 5, p. 327-337. 2009.

NITISS, J.L.; BECK, W.T. Antitopoisomerase drug action and resistance. **Eur. J. Cancer** v. 32A, n. 6, p. 958-966. 1996.

NORDMAN, J.; ORR-WEAVER, T.L. Regulation of DNA replication during development. **Development** v. 139, n. 3, p. 455-464. 2012.

OSHEROFF, N.; SHELTON, E.R.; BRUTLAG, D.L. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. **J. Biol. Chem.** v. 258, n. 15, p. 9536-9543. 1983.

**OSHEROFF, N.; BJORNSTI, M.A. DNA Topoisomerase Protocols Volume II: Enzymology and Drugs.** Methods in Molecular Biology. Totowa (NJ, USA):Humana Press. v.95. 2001. 334 p.

PARIS, M.; TETREAU, G.; LAURENT, F.; LELU, M.; DESPRES, L.; DAVID, J.P. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. **Pest. Manag. Sci.** v. 67, n. 1, p. 122-128. 2011.

PELEG, J. Growth of arboviruses in primary tissue culture of *Aedes aegypti* embryos. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 17, n. 2, p. 219-223. 1968.

PETERSEN, E.; WILSON, M.E.; TOUCH, S.; MCCLOSKEY, B.; MWABA, P.; BATES, M.; DAR, O.; MATTES, F.; KIDD, M.; IPPOLITO, G.; AZHAR, E.I.; ZUMLA, A. Rapid spread of Zika virus in the Americas - implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **Int. J. Infect. Dis.** v. 44, p. 11-15. 2016.

PHUC, H.K.; ANDREASEN, M.H.; BURTON, R.S.; VASS, C.; EPTON, M.J.; PAPE, G.; FU, G.; CONDON, K.C.; SCAIFE, S.; DONNELLY, C.A.; COLEMAN, P.G.; WHITE-COOPER, H.; ALPHEY, L. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.** v. 5, a. 11. 2007.

POLLETT, S.; MELENDREZ, M.C.; MALJKOVIC BERRY, I.; DUCHÊNE, S.; SALJE, H.; CUMMINGS, D.A.T.; JARMAN, R.G. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. **Infect. Genet.Evol.** v. 62, p. 279-295. 2018.

POLTRONIERI, P.; YOKOTA, T.; KOYAMA, Y.; HANAI, S.; UCHIDA, K.; MIWA, M. PARP cleavage in the apoptotic pathway in S2 cells from *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Cell Biol.** v. 75, n. 4, p. 445-449. 1997.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.L.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drug. **Chem. Biol.** v. 17, n. 5, p. 421-433. 2010.

POMMIER, Y.; SCHWARTZ, R.E.; KOHN, K.W.; ZWELLING, L.A. Formation and rejoining of deoxyribonucleic acid double-strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents. **Biochemistry** v. 23, n. 14, p. 3194-3320. 1984.

PONTES, R.J.S; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da Região Sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Rev. Saúde Pública** v. 28, n. 3, p. 218-227. 1994.

POPANDA, O.; THIELMANN, H.W. The function of DNA topoisomerases in UV-induced DNA excision repair: studies with specific inhibitors in permeabilized human fibroblasts. **Carcinogenesis** v. 13, n. 12, p. 2321-2328. 1992.

- POSTOW, L.; CRISONA, N.J.; PETER, B.J.; HARDY, C.D.; COZZARELLI, N.R. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 98, n. 15, p. 8219-8226. 2001.
- POWELL, J.R.; GLORIA-SORIA, A.; KOTSAKIOZI, P. Recent history of *Aedes aegypti*: vector genomics and epidemiology records. **Bioscience**. v. 68, n. 11, p. 854-860. 2018.
- PRACHUMWAT, A.; LI, W.H. Gene number expansion and contraction in vertebrate genomes with respect to invertebrate genomes. **Genome Res.** v. 18, n. 2, p. 221-232. 2008.
- PRIKHOD'KO, G.G.; WANG, Y.; FREULICH, E.; PRIVES, C.; MILLER, L.K. Baculovirus p33 binds human p53 and enhances p53-mediated apoptosis. **J. Virol.** v. 73, n. 2, p. 1227-1234. 1999.
- QIU, Z.; LIN, A.; LI, K.; LIN, W.; WANG, Q.; WEI, T.; ZHU, W.; LUO, P.; ZHANG, J. A novel mutation panel for predicting etoposide resistance in small-cell lung cancer. **Drug Des. Devel. Ther.** v. 13, p. 2021-2041. 2019.
- RAMPAKAKIS, E.; GKOGKAS, C.; DI PAOLA, D.; ZANNIS-HADJOPOULOS, M. Replication initiation and DNA topology: The twisted life of the origin. **J. Cell. Biochem.** v. 110, n. 1, p. 35-43. 2010.
- RAVID, K.; LU, J.; ZIMMET, J.M.; JONES, M.R. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. **J. Cell Physiol.** v. 190, n. 1, p. 7-20. 2002.
- RAY K, MERCEDES, M.; CHAN D.; CHOI, C.Y.; NISHIURA, J.T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. **J. Insect Sci.** v. 9, p. 1-13. 2009.
- REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of controls strategies. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v. 7, n. 2, p. 261-273. 2007.
- REY, L. Dípteros nematóceros: anofelinos e culicíneos. In: REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2008. p. 727-744. 888 p.
- RICH, J.T.; NEELY, J.G.; PANIELLO, R.C.; VOELKER, C.C.; NUSSENBAUM, B.; WANG, E.W. A practical guide to understanding Kaplan–Meier curves. **Otolaryngol. Head Neck Surg.** v. 143, n. 3, p. 331-336. 2010.
- RODMAN, T.C. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages. **Genetics** v. 55, n. 3, p. 375-386. 1967.
- RODRIGUES, R.P.; SUSIMAIRE, P.; MANTOANI, S.P.; DE ALMEIDA J.R.; PINSETTA, F.R.; SEMIGHINI, E.P.; DA SILVA, V.B.; DA SILVA, C.H.P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Rev. Virtual Quím.** v. 4, n. 6, p. 739-776. 2012.
- RUIZ, L.M.; SEGURA, C.; TRUJILLO, J.; ORDUZ, S. *In vivo* binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 1, p. 73-79. 2004.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** v. 4, n. 4, p. 406-425. 1987.
- SANTOS FILHO, O.A.; ALENCASTRO, R.B. Modelagem de proteínas por homologia. **Quím. Nova** v. 26, n. 2, p. 253-259. 2003.
- SAPETTO-REBOW, B.; MCLOUGHLIN, S.C.; O'SHEA, L.C.; O'LEARY, O.; WILLER, J.R.; ALVAREZ, Y.; COLLERY, R.; O'SULLIVAN, J.; VAN EEDEN, F.; HENSEY, C.; KENNEDY, B.N.

Maternal topoisomerase II $\alpha$ , not topoisomerase II $\beta$ , enables embryonic development of zebrafish *top2a*<sup>-/-</sup> mutants. **BMC Dev. Biol.** v. 11, a. 71. 2011.

SCHEINMAN, R.I.; GUALBERTO, A.; JEWELL, C.M.; CIDLOWSKI, J.A.; BALDWIN Jr., A.S. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. **Mol. Cell. Biol.** v. 15, n. 2, p. 943-953. 1995.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat. Protoc.** v. 3, n. 6, p. 1101-1108. 2008.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B.G.J.; SAMSON, R.A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **J. Insect Sci.** v. 4, n. 1, a. 19. 2004.

SCHRÖDINGER, L.L.C. **The PyMOL Molecular Graphics System**, versão 1.8. 2015.

SENGUPTA, T.; MUKHERJEE, M.; DAS, A.; MANDAL, C.; DAS, R.; MUKHERJEE, T.; MAJUMDER, H.K. Characterization of the ATPase activity of topoisomerase II from *Leishmania donovani* and identification of residues conferring resistance to etoposide. **Biochem. J.** v. 390 (pt. 2), p. 419-426. 2005.

SERVICE, M.W. Mosquito (Culicidae). In: LANE, R.P.; R.W. CROSSKEY (Org.). **Medical insect and arachnids**. 1. ed. Londres (UK): Chapman & Hall, 1993. p. 120-240. 723p.

SHAIU, W.L.; HU, T.; HSIEH, T.S. The hydrophilic, protease-sensitive terminal domains of eukaryotic DNA topoisomerases have essential intracellular functions. **Pac. Symp. Biocomput.** v. 1999, p. 578-589. 1999.

SHAO, Q.; YANG, B.; XU, Q.; LI, X.; LU, Z.; WANG, C.; HUANG, Y.; SÖDERHÄLL, K.; LING, E. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. **J. Biol. Chem.** v. 287, n. 17, p. 14270-14279. 2012.

SILVA, C.; GARY, B.D.; RAU, M.E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev. Comp. Immunol.** v. 24, n. 4, p. 367-379. 2000.

SIMOSSIS, V.A.; HERINGA, J. *PRALINE*: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. **Nucleic Acids Res.** v. 33, p. w289-w294. 2005.

SINGH, K.R.P. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). **Curr. Sci.** v. 36, n. 19, p. 506-508. 1967.

SORTIBRÁN, A.N.; TÉLLEZ, M.G.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerases I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** v. 604, n. 1-2, p. 83-90. 2006.

SPITZEN, J.; SMALLEGANGE, R.C.; TAKKEN, W. Effect of human odours and positioning of CO<sub>2</sub> release point on trap catches of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* in an olfactometer. **Physiol. Entomol.** v. 33, n. 2, p. 116-122. 2008.

STÄHELIN, H. Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. **Eur. J. Cancer.** v. 9, n. 3, p. 215-221. 1973.

TARACENA, M.L.; BOTTINO-ROJAS, V.; TALYULI, O.A.C.; WALTER-NUNO, A.B.; OLIVEIRA, J.H.M.; ANGLERÓ-RODRIGUEZ, Y.I.; WELLS, M.B.; DIMOPOULOS, G., OLIVEIRA, P.L.; PAIVA-SILVA, G.O. Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 12, n. 5, a. e0006498. 2018.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública** v. 18, n. 3, p. 867-871. 2002.

TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; PENNACCHIO, F.; DE EGUILEOR, M. Lepidopteran larval midgut during prepupal instar: digestion or self-digestion? **Autophagy** v. 3, n. 6, p. 630-631. 2007.

TOPCU, Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **J. Clin. Pharm. Ther.** v. 26, n. 6, p. 405-416. 2001.

TORRES, C.; CREUS, A.; MARCOS R. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. **Mutat. Res.** v. 413, n. 2, p. 191-203. 1988.

TORRES, S.M.; CUZ, N.L.N.; ROLIM, V.P.M.; CAVALCANTI, M.I.A.; ALVES, L.C.; JÚNIOR, V.A.S. Mortalidade acumulativa de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com compostos. **Rev. Saúde Pública** v. 48, n. 3, p. 445-450. 2014.

TSE-DINH, Y.C. Bacterial and archeal type I topoisomerases. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1400, n. 1-3, p. 19-27. 1998.

TUDURI, S.; CRABBÉ, L.; CONTI, C.; TOURRIÈRE, H.; HOLTGREVE-GREZ, H.; JAUCH, A.; PANTESCO, V.; VOS, D.J.; THOMAS, A.; THEILLET, C.; POMMIER, Y.; TAZI, J.; COQUELLE, A.; PASERO, P. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. **Nat. Cell Biol.** v. 11, n. 11, p. 1315-1324. 2009.

VALOTTO, C.F.; SILVA, H.H.; CAVASIN, G.; GERIS, R.; RODRIGUES-FILHO, E.; DA SILVA, I.G. Ultrastructural alterations in larvae of *Aedes aegypti* subject to labdane diterpene isolated from *Copaifera reticulata* (Leguminosae) and a fraction enriched with tannins of *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 44, n. 2, p. 194-200. 2011.

VALOTTO, C.F.; SILVA, H.H.; CAVASIN, G.; SILVA, H.H.G; GERIS, R; DA SILVA, I.G. Morpho-histological changes in *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) caused by the catechaltanine isolated from the cerrado plant *Magoniapubescens*(Sapindaceae). **J. Trop. Pathol.** v. 39, n. 4, p. 309-321. 2010.

VARGA-WEISZ, P.D.; WILM, M.; BONTE, E.; DUMAS, K.; MANN, M.; BECKER, P.B. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. **Nature** v. 388, n. 6642, p. 598-602. 1997.

VASCONCELOS, P.F.C. Yellow fever. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 2, p. 275-293. 2003.

VITAL, W.; REZENDE, G.L.; ABREU, L.; MORAES, J.; LEMOS, F.J.; VAZ Jr., I. S.; LOGULLO, C. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. **BMC Dev. Biol.** v. 10, a. 25. 2010.

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 12, n. 6, p. 385-392. 2011.

VOLOGODSKII, A.; RYBENKOV, V.V. Simulation of DNA catenanes. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 11, n. 45, p. 10543-10552. 2009.

VOS, S.M.; TRETTER, E.M.; SCHMIDT, B.H.; BERGER, J.M. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 12, n. 12, 827-841. 2011.

VOSBERG, H.P. DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 114, p. 19-102. 1985.

VOUGA, M.; CHIU, Y.C.; POMAR, L.; DE MEYER, S.V.; MASMEJAN, S.; GENTON, B.; MUSSO, D.; BAUD, D.; STOJANOV, M. Dengue, Zika and chikungunya during pregnancy: pre- and post-travel advice and clinical management. **J. Travel Med.** v. 26, n. 8, pii: taz077. 2019.

WALKER, N.I.; HARMON, B.V.; GOBÉ, G.C.; KERR, J.F. Patterns of cell death. **Methods Achiev. Exp. Pathol.** v. 13, p. 18-54. 1988.

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

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

WANG, J.C. **Untangling the double helix**: DNA entanglement and the action of the DNA topoisomerases. 1. ed. *Cold Spring Harbor (NY, USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. 233 p.*

WATANABE, R.M.; SOARES, T.S.; K. MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A.M.; MACIEL, C.; CAPURRO, M.L.; TORQUATO, R.J.; TANAKA.A.S. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity. **Biochimiev.** 92, p. 933-939. 2010.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F.T.; DE BEER, T.A.P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. **SWISS-MODEL**: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Res.** v. 46 (W1), p. w296-w303. 2018.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia Molecular do Gene**. 7. ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2015. 912 p.

WEAVER, S.C.; COSTA, F.; GARCIA-BLANCO, M.A.; KO, A.I.; RIBEIRO, G.S.; SAADE, G.; SHI, P.Y.; VASILAKIS, N. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Res.** v. 130, p. 69-80. 2016.

WEISSIG, V.; VETRO-WIDENHOUSE, T.S.; ROWE, T.C. Topoisomerase II inhibitors induce cleavage of nuclear and 35-kb plastid DNAs in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **DNA Cell Biol.** v. 16, n. 12, p. 1483-1492. 1997.

WENDORFF, T.J.; SCHMIDT, B.H.; HESLOP, P.; AUSTIN, C.A.; BERGER, J.M. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. **J. Mol. Biol.** v. 424, n. 3-4, p. 109-124. 2012.

WEST, K.L.; MECZES, E.L.; THORN, R.; TURNBULL, R.M.; MARSHALL, R.; AUSTIN, C.A. Mutagenesis of E477 or K505 in the B' domain of human topoisomerase II $\beta$  increases the requirement for magnesium ions during strand passage. **Biochemistry** v. 39, n. 6, p. 1223-1233. 2000.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. *ProSA-web*: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Res.** v. 35, p. 407-410. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Nova edição. Geneva: World Health Organization-WHO Press, 2009. 160 p. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

WU, C.C. LI, T.K.; FARH, L.; LIN, L.Y.; LIN, T.S.; YU, Y.J.; YEN, T.J.; CHIANG, C.W.; CHAN, N.L. Structural basis of Type II Topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. **Science.** v. 333, n. 6041, p. 459-462. 2011.

XIAO, L.; ZHAO, W.; LI, H.M.; WAN, D.J.; LI, D.S.; CHEN, T.; TANG, Y.J. Design and synthesis of the novel DNA topoisomerase II inhibitors: esterification and amination substituted 4'-demethylepipodophyllotoxin derivatives exhibiting anti-tumor activity by activating ATM/ATR signaling pathways. **Eur. J. Med. Chem.** v. 80, p. 267-77. 2014.

XU, D.; ZHANG, Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. **Biophys. J.** v. 101, n. 10, p. 2525-2534. 2011.

YANG, X.; LI, W.; PRESCOTT, E.D.; BURDEN, S.J.; WANG, J.C. DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development. **Science** v. 287, n. 5450, p. 131-134. 2000.

YOSHIOKA, M.; COURET, J.; KIM, F.; MCMILLAN, J.; BURKOT, T.R.; DOTSON, E.M.; KITRON, U.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M. Diet and density dependent competition affect larval performance and oviposition site selection in the mosquito species *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasit. Vectors** v. 5, a. 225. 2012.

ZDRALJEVIC, S.; STRAND, C.; SEIDEL, H.S.; COOK, D.E.; DOENCH, J.G.; ANDERSEN, E.C. Natural variation in a single amino acid substitution underlies physiological responses to topoisomerase II poisons. **PLoS Genet.** v. 13, n. 7, a. e1006891. 2017.

ZECHIEDRICH, E.L.; KHODURSKY, A.B.; BACHELLIER, S.; SCHNEIDER, R.; CHEN, D.; LILLEY, D.M.; COZZARELLI, N.R. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 11, p. 8103-8113. 2000.

ZWELLING, L.A.; MICHAELS, S.; ERICKSON, L.C.; UNGERLEIDER, R.S.; NICHOLS, M.; KOHN, K.W. Protein-associated deoxyribonucleic acid strand breaks in L1210 cells treated with the deoxyribonucleic acid intercalating agents 4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide and adriamycin. **Biochemistry** v. 20, n. 23, p. 6553-6563. 1981.



**ANEXO 1: Artigo publicado como primeira autoria**

Inhibition of *Aedes aegypti* DNA topoisomerase II by etoposide: Impact on survival and morphology of larvae and pupae

Daniele Santos, Helga F. Gomes, Lupis Ribeiro, André B. Farias, Nelilma C. Romeiro, Rodrigo Nunes da Fonseca, José L. Nepomuceno-Silva, Jorge Moraes



PII: S1532-0456(21)00093-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109066>

Reference: CBC 109066

To appear in: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*

Received date: 9 December 2020

Revised date: 18 April 2021

Accepted date: 21 April 2021

Please cite this article as: D. Santos, H.F. Gomes, L. Ribeiro, et al., Inhibition of *Aedes aegypti* DNA topoisomerase II by etoposide: Impact on survival and morphology of larvae and pupae, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109066>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

## **Inhibition of *Aedes aegypti* DNA topoisomerase II by etoposide: impact on survival and morphology of larvae and pupae**

Daniele Santos<sup>1</sup>, Helga F. Gomes<sup>1</sup>, Lupis Ribeiro<sup>2</sup>, André B. Farias<sup>3,4</sup>, Nelilma C. Romeiro<sup>4</sup>, Rodrigo Nunes da Fonseca<sup>2</sup>, José L. Nepomuceno-Silva<sup>1</sup>, Jorge Moraes<sup>1\*</sup>

1. Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda, NUPEM, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida São José Barreto, N° 764, Bairro: São José do Barreto, Macaé – RJ, CEP: 27.965-045, Brasil.

2. Laboratório Integrado Ciências Morfofuncionais, NUPEM, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida São José Barreto, N° 764, Bairro: São José do Barreto, Macaé – RJ, CEP: 27.965-045, Brasil.

3. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP: 21941-909, Brasil.

4. Laboratório Integrado de Computação Científica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Avenida Aluísio da Silva Gomes, 50, CEP 27930-560, Granja dos Cavaleiros, Macaé, RJ, Brasil.

\* Corresponding author

### **Abstract**

DNA topoisomerase II enzymes maintain DNA stability during vital processes, such as genome replication, transcription and chromosomal segregation during mitosis and meiosis. In the present work, we analyzed functional aspects of the DNA topoisomerase II (AeTopII) enzyme of the mosquito *Aedes aegypti*. Here, we show that AeTopII mRNA is expressed at all stages of mosquito development. By *in situ* hybridization, we found that the AeTopII mRNA is concentrated along the ovarian follicular cells as well as in the region of the follicles. The observed expression profiles likely reflect increased topoisomerase II cellular requirements due to the intense ovarian growth and egg production following blood feeding in *Ae. aegypti* females. The drug etoposide, a classic inhibitor of topoisomerase II, was used for *in vivo* testing with 2<sup>nd</sup> stage larvae, in order to investigate the functional importance of this enzyme in *Ae. aegypti* survival and development. Inhibition of topoisomerase II activity with etoposide concentrations ranging from 10 to 200  $\mu$ M did not lead to the immediate death of larvae. However, after 10 days of observation, etoposide treatments resulted in 30-40% decrease in survival, in a dose dependent manner, with persisting larvae and pupae presenting incomplete development, as well as morphological abnormalities. Also, approximately 50% of the treated larvae did not reach the pupal stage. Thus, we conclude that AeTopII is a vital enzyme in the development of *Ae. aegypti* and its

sensitivity to inhibitors should be explored for potential chemical agents to be used in vector control.

### **Introduction**

The *Aedes aegypti* mosquito is considered one of the main public health issues in tropical countries due to its role in the transmission of arboviruses, such as dengue, Zika, chikungunya and yellow fever (Fontenille and Powell, 2021). Currently, the insect vector is considered to be the most vulnerable link in the epidemiological chain of transmission of these arboviruses, thereby justifying vector control as the main strategy to reduce the impact of these epidemics worldwide (WHO, 2009). *Aedes aegypti* is well adapted to urban habitats, which has led to high exposure to insecticides and, consequently, to the development of resistance to chemical agents traditionally employed in its control (Ayorinde et al., 2015). Since the global spread of insecticide resistance is a serious threat to the control of arboviruses, the search for new molecular targets that directly inhibit vital processes of *Ae. aegypti* represents an important step in establishing alternative vector control strategies (Moyes et al., 2017).

DNA topoisomerases are present in all living organisms and are responsible for the dynamic maintenance of DNA topological status. These enzymes promote untangling of the double helix by catalyzing cleavage and ligation of DNA chains involved in several fundamental biological processes, such as transcription, replication and chromosome segregation during cellular division (Champoux, 2001, Wang, 2002). The DNA topoisomerases can be divided into two major classes (I and II), which differ mainly in their mechanism of action (Wang, 2002). Class I DNA topoisomerases (Top I) bind to DNA and cleave a single strand of the double helix, resulting in a 5' phosphate covalently bound to a tyrosine residue from the active site during the catalytic cycle. The intact DNA segment is then passed through the cleaved region and the free ends of the cleaved segment are re-ligated, thus relaxing the DNA structure (Lima et al., 1994). This activity is important during the progressive movement of replication and transcription forks, as well as during interactions with chromatin proteins (Wang, 2002). Class II DNA topoisomerases are homodimers that able to cut both strands of the DNA double helix at the same time in an ATP-dependent reaction. The double strand break allows another segment of DNA to be translocated through the cleavage site. Similar to Top I, covalent bonds are also formed between tyrosines of the active site and 5' phosphates in each cleaved strand in this reaction, thus ensuring restoration of DNA integrity at the terminus of the catalytic cycle (Bergerat et al., 1997). In addition to relaxing the DNA structure, double strand breaks produced by type

II topoisomerases enzymes also allow for intertwined DNA molecules to be resolved, which is essential for chromosomal segregation during cell division (Holm et al., 1985, Akimitsu et al., 2003).

In the past few decades, DNA topoisomerase enzymes have been used as molecular targets in the development of pharmacological inhibitors for various therapeutic strategies, including to fight cancer and bacterial diseases, as well as many studies considering their potential as antiparasitic agents (Cheesman, 2000, D'atanasio et al., 2020, Kolarič et al., 2020). Etoposide (VP-16-213), which is derived from epipodophyllotoxin, is one of the most well-known inhibitors of type II topoisomerase enzymes and is used clinically in the therapy of some tumors (Topcu, 2001, Pommier et al., 2010). Etoposide belongs to a class of inhibitors whose mechanism of action consists of stabilizing the covalent enzyme-DNA complex. In addition to interrupting essential biological processes, the stabilization of this complex also promotes permanent breaks in the structure of the DNA in the segment bound to the enzyme, which is considered to be the main cause of the persistent DNA damage and, consequently, the cytotoxicity of these inhibitors (Nitiss and Beck, 1996, Bandele and Osheroff, 2008, De Campos et al., 2017). The inhibitory properties of etoposide have also been studied in the parasites that cause malaria and trypanosomiasis (Hande, 1998, Kelly et al., 2006, Mudeppa et al., 2015, Shapiro and Showalter, 1994). To date, there are no published studies concerning the effects of type II topoisomerase inhibitors on the development of insect vectors. Additionally, there are no available reports on the potential of insect type II topoisomerase enzymes as molecular targets for the development of vector control agents. In this context, the present study identifies a gene encoding a DNA type II topoisomerase enzyme in the genome of the *Ae. aegypti* mosquito (AeTopII) and determines its mRNA expression profile throughout all stages of development and in blood-fed adult females. Additionally, this work evaluates the effects of type II topoisomerase inhibition by etoposide on the survival and development of *Ae. aegypti*.

## Methods

### Colony of *Aedes aegypti*

*Ae. aegypti* mosquitoes of the Rockefeller strain were collected at the insectary of the Integrated Biochemistry Laboratory Hatisaburo Masuda - LIBHM, at UFRJ/ Campus Macaé, and maintained in a cycle of 12 hours light/12 hours dark at a relative humidity of 60-70% and temperature of 28 °C. Adults insects were kept in plastic cages measuring 25 × 20 cm in diameter and fed 10% sucrose solution *ad libitum*. The adults were fed a blood meal every 7 days in Swiss mice. The larvae were reared in trays measuring 45 × 25 cm in diameter

containing 1 L of water and approximately 500 mg of crushed mice food (Nuvilab CR-1, Quimtia).

### **Molecular phylogeny**

The predicted peptide sequences of the type II DNA topoisomerase enzymes were collected through BlastP similarity searches in the NCBI's RefSeq database, using the TopII peptide sequence of *Drosophila melanogaster* (NP\_476760) as a bait. The sequences of selected organisms were aligned with the ClustalX program (v. 2.0) and the phylogenetic reconstructions were performed using the MEGA X program (v. 10.0.5) (Kumar et al., 2018). The cladogram was constructed using the Neighbor-Joining algorithm (with Poisson correction and pairwise gap deletion, using 1,000 bootstrap replicates). The TopII of *Saccharomyces cerevisiae* was chosen as an outgroup and used to root the trees.

### **Structural model prediction and molecular docking**

Etoposide structure was built and energy-optimised in Spartan 08' with a PM3 semi-empirical method. AeTopII homology based model was obtained in the server SwissModel, using the human TopII- $\beta$  structure (3QX3) as template (Wu et al., 2011), and refined with ModRefiner server. The geometric parameters of the structure were validated with the Rampage server, which generated the Ramachandran plot (Supplementary figure S4). Molecular docking was performed with the software GOLD (v 5.7.0), and Score, Chemscore, ChemPLP and Goldscore functions were used for docking analysis, varying the search radius from 10 to 20 Å around the nitrogen atom from the Arg505 catalytic residue of AeTopII. The structure of the refined model and molecular docking with etoposide were visualized with PyMOL (v.2.4.0a0) and BICVIA Discovery Studio (v.16.1.0.15350).

### **Design of PCR primers**

Nucleotide sequences for *Ae. aegypti* genes encoding AeTopII, ribosomal protein S7 (RPS7) and Oskar were obtained in Vectorbase (<https://www.vectorbase.org/>) and NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *In situ* hybridization and RT-qPCR primer pairs were designed with the Oligo Analyzer Tool and Real Time PCR Tool programs, both from IDT-Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/scitools/Applications/>), and synthesized by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). All primer sequences and amplicon sizes used in this study are provided in the supplementary data (Supplementary Table 1).

### **cDNA synthesis and quantitative real-time RT-PCR**

Total RNA was extracted from approximately 100 mg of tissue of *Ae. aegypti* in the pupal stage, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> larval stages, eggs (5 days) and blood or sucrose-fed 7 day old adult females. Additionally, total RNA was extracted from dissected fat body, intestine and

ovaries of sucrose-fed and 48 h post-blood fed female insects. The TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) was used for all extractions, following the manufacturer's instructions, and three independent biological replicates were used for each assay. cDNA was synthesized from 1 µg of RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions. The synthesized cDNA was used as a template for RT-qPCR relative expression analysis using the SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems). The reactions were prepared as follows: 5 µL of cDNA diluted to 1:10, 7.5 µL of SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, 250 nM of each primer and then nuclease free deionized water was added to 15 µL. Cycle conditions consisted of a 20 s initial denaturation step at 95 °C followed by 40 cycles of a 1 s denaturation step at 95 °C followed by a 20 s annealing/extension step at 60 °C. Reaction temperatures were then gradually raised from 45 to 95 °C to obtain the melting curves. The RT-qPCR reactions were performed in triplicate and the melting curves were examined to ensure specificity of the amplification. The results, which were recorded in Ct values (threshold cycle), were converted into relative expression values using the “ $\Delta$ Ct” (Schmittgen and Livak, 2008) or “ $\Delta\Delta$ Ct” methods (Livak and Schmittgen, 2001), with S7-RPS7 mRNA used as a reference of invariant expression.

Statistical analyses of RT-qPCR data were performed using the GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 program (v. 6.01; GraphPad Software, Inc.). Student's *t* test was used for comparing expression levels in sucrose and blood-fed mosquitoes, while one-way ANOVA with Tukey post-hoc analysis was used for multiple comparisons.

### **Synthesis of the RNA probe and *in situ* hybridization**

cDNA obtained from the 3<sup>rd</sup> larval stage of *Ae. aegypti* was used as a template for the synthesis of sense and antisense RNA probes for AeTopII mRNA *in situ* hybridization. A double strand template for RNA synthesis was constructed via two sequential PCRs using the GoTaq<sup>®</sup> G2 Flexi DNA Polymerase (Promega), following the manufacturer instructions. Specific primers with T7 RNA Pol promoter adapters at the 5' end (Supplementary Table 1) were used for the first reaction. The product of this first reaction served as a template for the second PCR reaction, which used universal primers directed towards the T7 RNA Pol promoter sequence (Supplementary Table 1). In this reaction, the universal forward primer was used to make the sense RNA guide probe while the universal reverse primer was used for the antisense RNA guide probe. The products obtained in the second PCR reaction served as templates for the synthesis of RNA probes, using the Maxiscript T7 kit (AMBION), according to the manufacturer's instructions. *Oskar* mRNA was used as a positive control for *in situ* hybridization (Juhn and James, 2006) and its template was PCR amplified from

cdDNA obtained from 100 µg of fresh laid mosquito eggs.

The ovaries of female *Ae. aegypti* specimens were dissected 36 hours after a blood feeding and submitted to the procedure of tissue preparation and *in situ* hybridization, following the protocol described by Juhn and James (Juhn and James, 2012). The tissues were analyzed and images were recorded using a stereo microscope, model M205FA (Leica).

### **Etoposide activity bioassay**

Etoposide (VP-16-213; Sigma-Aldrich), at concentrations of 10, 50, 100, 150 and 200 µM, was used in the bioassay of larvicidal activity. This experiment was performed with three replicates in 6-well culture plates, containing 6.5 mL of distilled water and 20 2<sup>nd</sup> stage larvae per well, comprising a total of 60 larvae for each treatment. Negative controls consisted of larvae kept in 0.2% vehicle (DMSO), in distilled water. All wells were supplied with crushed mice food (Nuvilab CR-1, Quimtia). Larvae survival was assessed at 24 h intervals with the aid of a stereoscopic microscope. Non-motile larvae were evaluated as dead, counted and then removed from the test. Daily observations occurred for 10 days and the number of pupae formed during this period was also registered.

Survival was analyzed by Kaplan-Meier plot using the Mantel-Cox logrank test to check for significant differences and Gehan-Breslow-Wilcoxon test to check for trend or dose-response. These analyses were performed using the GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 program.

### **Morphological analysis of larvae exposed to etoposide**

Morphological analysis of the etoposide-treated larvae was performed in 12-well culture plates containing 2.5 mL distilled water with five 2<sup>nd</sup> stage larvae per well. Control larvae were kept in 0.2% DMSO. Records of larval morphology were made on the 8<sup>th</sup> day of observation under a stereo microscope, model M205FA (Leica).

## **Results**

### **Identification of DNA topoisomerase II in *Ae. aegypti***

As we could not find any previous studies regarding type II topoisomerase enzymes in *Ae. aegypti*, we first sought to identify this gene in publicly available sequence databases. Searching for TopII sequences revealed that the *Ae. aegypti* genome (Liverpool AGWG strain) presents a single copy of the gene encoding this enzyme (access code at VectorBase: AAEL018244). Phylogenetic reconstructions revealed that it is a *bona-fide* Diptera gene, closely related to the well characterized *D. melanogaster* type II topoisomerase enzyme (Supplementary Figure S1). The TopII gene from *Ae. aegypti* (AAEL018244) has an open reading frame of 4,524 bp, which encodes a polypeptide chain of 1,507 amino acids with an estimated molecular mass of 171,016 kDa. The multiple alignment (Supplementary Figure



S2) shows a high degree of conservation between type II topoisomerase enzymes from *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* and *Homo sapiens* ( $\alpha$ -isoform), including the presence of conserved gyrase B and A domains (GyrB and GyrA), as well as TOPRIM and ATPase motifs and the essential tyrosine residue (Y82), which is covalently bound to DNA during the catalytic cycle. The predicted amino acid sequence of AeTopII shares 69% identity and 81% similarity in 1,394 residues with the *D. melanogaster* TopII orthologue and 64% identity and 78% similarity in 1,180 residues with human  $\alpha$  isoform. Notably, the most evident differences are found in the predicted dimerization site (Supplementary Figure S2). Additionally, the *Ae. aegypti* type II topoisomerase enzyme has a predicted bipartite nuclear localization signal (NLS) near the C-terminus, between positions 1,460 and 1,485, close, but not juxtaposed, to the experimentally characterized NLS of the human enzyme (Supplementary Figure S2).

### **AeTopII mRNA is expressed at all stages of the *Ae. aegypti* life cycle**

In order to understand the importance of AeTopII in the development of *Ae. aegypti*, we examined relative mRNA expression levels throughout the immature stages of the mosquito life cycle (Figure 1). Although AeTopII mRNA can be detected in all developmental stages, the lower expression levels occur during the pupal stage. In fact, expression levels of AeTopII mRNA in pupae are statistically different from the expression level in eggs as well as in 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> stage larvae. In particular, levels of AeTopII mRNA are approximately 4 times lower in pupae than in 4<sup>th</sup> stage larvae.

To investigate the influence of nutritional input on the expression of AeTopII mRNA in adult mosquitoes, we compared its relative expression levels between blood-fed and sucrose-fed females. The expression of AeTopII mRNA in blood-fed females was approximately 10 times higher than the expression in females fed with only sucrose (Figure 2-A). Next, we attempted to determine which internal organs express the highest levels of AeTopII mRNA when mosquitoes are fed with blood. We found that expression of AeTopII mRNA was much higher in the ovaries than any other organs examined, with relative expression levels being approximately 11-fold higher than in fat body, for example (Figure 2-B).

### **AeTopII mRNA is expressed mostly by follicular cells within the ovaries**

As the insect ovary is a relatively complex organ, containing several cell types performing various physiologic roles, we attempted to identify which ovarian cells expressed the highest levels of AeTopII expression in blood-fed females using an *in situ* hybridization approach. The antisense probe for the AeTopII mRNA stained the epithelial cells surrounding each oocyte across the entire ovary (Figure 3). The presence of these cells in this region was

confirmed via nuclear fluorescence using DAPI (Figure 3-B). When observing the isolated egg chamber under greater magnification (Figure 4), we found staining of the antisense probe on follicular cells (fc) and in the region of grouped secondary and tertiary follicles (f2 and f3). A positive control for the *in situ* hybridization technique was performed using an antisense probe for the *oskar* gene, in which we obtained an expected staining pattern in the region of the follicles (f2 and f3) in the egg chamber (Supplementary Figure S3).

### **Molecular docking of etoposide with AeTopII**

Etoposide (VP-16-213) is a well-known inhibitor of mammalian type II topoisomerase and its effect on cells and tissues of *D. melanogaster* have been previously characterized (Poltronieri et al., 1997). We have constructed a computational model of AeTopII, based on the experimentally solved structure of human TopII- $\beta$  enzyme complexed with etoposide (Wu et al., 2011), in order to validate the use of this molecule as an inhibitor of the mosquito enzyme. The comparative model of DNA Topoisomerase II from *Ae. Aegypti* shows that the enzyme is a homodimer with 53  $\alpha$ -helices and 44  $\beta$ -sheets in each monomer (Figure 5-A). Docking studies indicate that etoposide is able to interact consistently with a predicted model of AeTopII homodimer. The top pose obtained by molecular docking of etoposide with the AeTopII is illustrated in figure 5 (B-C) and present score values of 95.61 and 60.70, for chains A and B, respectively. Overall, etoposide is able to form several interactions with the enzyme, such as hydrogen bonds, Van der Waals and  $\pi$ -alkyl with amino acid residues located in the TOPRIM motifs and with nitrogenous bases from the associated DNA segment (Supplementary Figure S5 and Supplementary Table 2). Thus, the results of molecular docking support the use of etoposide in bioassays with larvae of *Aedes aegypti*.

### **Treatment with etoposide reduces the survival of *Ae. aegypti* larvae**

We established a bioassay to investigate the effects of inhibition of *Ae. aegypti* type II topoisomerase activity on survival and development of larvae. Kaplan-Meier survival plot showed that more than 95% of the larvae in the control group remained alive after 10 days, while the survival of the etoposide treated groups ranged from 73% (10  $\mu$ M) to 62% (200  $\mu$ M) (Supplementary Table 1). Furthermore, the survival curves were statistically different and presented a dose-dependent effect (Figure 6-A, Supplementary Figures S6 and S7A-B). Regarding the effects of etoposide on larval survival, we also observed a marked reduction in pupae formation, which ranged from 43.8% (10  $\mu$ M) to 29.8% (200  $\mu$ M), compared to the control group, which showed 95% pupae formation (Figure 6-B). Furthermore, we noticed

that the larvae that did not undergo metamorphosis to the pupal stage seemed to remain arrested in the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> or 4<sup>th</sup> larval stages (data not shown). Thus, the detrimental effects of etoposide on *Ae. aegypti* appear to be even more pronounced on development, when compared to larvae survival.

### **Etoposide treatment induces morphological changes in *Ae. aegypti* larvae and pupae**

In order to investigate the effects of type II topoisomerase inhibition on *Ae. aegypti* external larvae anatomy, we treated stage 2 larvae with 50, 100 or 200  $\mu\text{M}$  of etoposide and examined the insects on the 8<sup>th</sup> day of exposure. While insects in the control group presented the normal, expected morphological characteristics of stage 4 larvae (Supplementary Figure S8-A), the group exposed to etoposide presented larvae of various sizes, compatible with the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> developmental stages. Some individuals exposed to the inhibitor also presented atypical morphology and pigmentation of the thorax and siphon, when compared to the larvae of the control group (Supplementary Figure 8-B, C and D).

The larvae of the control group displayed determining characteristics of the 4th larval stage, including a typical pigmentation profile and expected body anatomy of the head, thorax and abdominal segments. The structure of the anal lobule, as well as the appearance of gills and the siphon, represent regular aspects in the control larva (Figure 7-A). In contrast, the larvae exposed to 50 and 100  $\mu\text{M}$  of etoposide presented an altered body color, with atypical darker pigmentation in both the thoracic and abdominal regions, extending to the gills attached to the anal lobe. Interestingly, the gills also seemed to appear more inflated than those observed in control animals (Figure 7-B and C). Larvae treated with 200  $\mu\text{M}$  of etoposide showed a lighter color, characteristic of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> larval stages, with an apparently smaller body anatomy (Figure 7-E). Some of these larvae also had dark spots on the thorax and in the anal lobe region (Figure 7-D, E and F).

Morphological differences were also noted in insects that succeeded in molting to the pupal stage in the presence of etoposide (Figure 8). Pupae with normal development demonstrate a regular body anatomy, with a prominent cephalothorax and abdomen with a characteristic “comma” shape (Figure 8-A). Interestingly, the pupae of insects treated with etoposide did not achieve the complete curvature of the abdominal segments similar to that seen in pupae of the control group (Figure 8-B, C and D), potentially resulting in the loss of buoyancy. Additionally, pupae formed in the presence of 100  $\mu\text{M}$  etoposide were darkly pigmented along the entire length of the cephalothorax and abdomen (Figure 8-C). Finally, in the presence of 200  $\mu\text{M}$  etoposide, irregular morphology of the cephalothorax was observed, alongside additional evidence of defects in metamorphosis in adult mosquitoes (Figure 8-D).

## Discussion

In recent decades, studies involving type II DNA topoisomerase have gained prominence due to the application of inhibitors of these enzymes in antitumor and antimicrobial therapies (Hooper and Jacoby, 2016, Bjornsti and Kaufmann, 2019). However, the role of these enzymes, as well as the effects of their inhibition, are not well described concerning arthropod vectors of diseases, such as *Ae. aegypti*. In the present work, we carried out a functional characterization of this enzyme in the mosquito *Ae. Aegypti*, starting from *in silico* analysis, where a single predicted sequence for this enzyme was found and designated as AeTopII. Phylogenetic reconstructions confirmed that these invertebrates have only one isoform of the type II topoisomerase enzyme (Supplementary Figure S1), which occurred in a different clade from the two isoforms found in vertebrates. The genomic duplication seen in the basal branches of the vertebrate lineage probably explain the existence of the alpha and beta isoforms of this enzyme in vertebrate organisms (Deniel and Boore, 2005, Blomme et al., 2006, Prachumwat and Li, 2008).

Eukaryotic type II DNA topoisomerase enzymes share high sequence similarity (Champoux, 2001). Thus, we verified a high conservation of the amino acid residues of the enzyme throughout the sequences of *Ae. aegypti*, *D. melanogaster* and *H. sapiens* (Supplementary Figure S2). The composition of residues in the insect type II topoisomerase is similar to that of the human alpha isoform functional domains (GyrB and GyrA), in regards to the ATPase and TOPRIM motifs (a conserved catalytic domain), as well as the tyrosine residue, Y82, which binds to DNA during the catalytic cycle (Supplementary Figure S2). However, the C-terminal domain frequently has a lower degree of conservation, showing greater similarity only among closely related species. This region usually includes domains involved in cell addressing and interactions with other proteins (Shaiu et al., 1999). As expected, the most dissimilar sequences, both in relation to the human enzyme and that of *D. melanogaster*, were found in the C-terminal domain, where there is a putative bipartite type signal for nuclear localization. Thus, our results indicate that the primary structure of AeTopII has the characteristics expected for a class IIA DNA topoisomerase enzyme.

In a way, the results of the gene expression analysis reflected participation by the AeTopII enzyme in all stages of mosquito development (Figure 1). The higher expression levels of AeTopII observed in blood-fed females (Figure 2-A), especially in the ovaries, suggests participation by AeTopII in the process of cell division occurring during ovarian development (Figure 2-B) (Briegel et al., 2003).

In anautogenous mosquitoes, such as *Ae. aegypti*, complete ovarian maturation occurs

only after the ingestion of a blood meal (Cho and Raikhel, 2001), which triggers vitellogenic growth of the oocyte, characterized by a rapid increase in the size of the ovaries (Basile, 1969). Localization of AeTopII mRNA by *in situ* hybridization (Figure 3) revealed comparatively intense expression of the enzyme in the follicular epithelium surrounding the egg chamber. It is important to note that, in dipterans, primordial follicular cells are located at the base of each follicle, close to the oocyte. In *D. melanogaster*, reductions in the levels of TopII mRNA expression via RNAi promoted female sterility and chromosomal defects in the ovaries, including failures in chromosomal segregation during meiosis I (Hughes and Hawley, 2014). The presence of AeTopII mRNA in the follicular cells and follicles (Figures 3 and 4) of the egg chamber suggest participation of this enzyme in the processes involved in progression of the ovarian cell cycle in these mosquitoes after feeding.

The expression profile of the AeTopII gene probably reflects the function that each organ plays throughout a mosquito's biological cycle. In fat body culture of *Ae. aegypti* culicids, given the dietary nutritional signals, fat body cells (trophocytes) usually increase in size (Hansen et al., 2004), and cell proliferation of trophocytes occurs predominantly in the larval and pupal phases (Clements, 1963). Thus, it is likely that the activity of the fat body during vitellogenesis is associated only with an increase in the volume and metabolism of trophocytes and not with the proliferation of these cells, explaining the lower expression of the AeTopII mRNA in this organ (Figure 2-B). The expression levels observed in the intestine, on the other hand, possibly reflect a natural response to the blood diet, as previous authors have described a lower average numbers of mitotic cells after blood feeding in the intestinal epithelium of *Ae. aegypti* females, when compared to the intestines of sucrose-fed females (Taracena et al., 2018). This reduction in the number of dividing intestinal cells likely occurs in response to oxidative stress mechanisms caused by blood ingestion (Taracena et al., 2018). Thus, the lower replicative capacity observed may be associated with the low levels of AeTopII gene expression observed (Figure 2-B), since this enzyme actively participates in events involving cell replication in organisms.

Etoposide has been reported as a type II DNA topoisomerase inhibitor in assays involving invertebrates, such as *D. melanogaster* (Poltronieri et al., 1997) and the nematode, *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 2017). In the current study, we shown that etoposide is able to bind the mosquito DNA Topoisomerase II enzyme (Figures 5B-C) through chemical interactions such as hydrogen bonds, Van der Waals and  $\pi$ -alkyl (Supplementary figure S5 and Supplementary Table 2) and induces mortality of *Ae. aegypti* larvae in a dose-dependent

manner (Figure 6-A). We emphasize that it was not possible to estimate the absolute LC50 under the observed experimental conditions, since, in all concentrations of the test, the larvae survival remained above 40% (Supplementary Table 3) but we know that the 48 hours LC50 in mosquito Aag2 cells is ~65  $\mu$ M, determined by the MTT test to check cell viability (data not shown). Additionally, with regards to etoposide's effects on survival, this inhibitor resulted in various morphological alterations in the tested larvae (Figure 7), represented mainly by deposition of material in the structure of the gills (50 and 100  $\mu$ M) and by atypical body pigmentation (50, 100 and 200  $\mu$ M). We conclude that etoposide treatment blocks the development of *Ae. aegypti* larvae (Figure 7-B, C, D, E and F). Thus, even though not acting as an acute lethal compound against *Ae. aegypti* larvae, the inhibition of type II topoisomerase by etoposide has a severe impact in the mosquito development, drastically reducing its ability to achieve the adult stage.

We observed that *Ae. aegypti* larvae are susceptible to inhibition of type II topoisomerase function. Inhibition of type II topoisomerase activity in the nematode invertebrates *C. elegans* and *Brugia malayi* resulted in significant reductions in egg growth, laying and hatching, as well as damage to gonadal tissue, reduction of embryonic activity and worm mortality (Lee et al., 2017, Misra-Fnattacharya et al., 2004). Although we did not evaluate other parameters in the current study, we suggest that inhibition of the action of the type II topoisomerase enzyme in *Ae. aegypti* has the potential for eliciting significant biological effects on the vector.

Relating to the morpho-physiological changes observed in the larvae in our tests with etoposide, it is possible that the dark body pigmentation, which occurred at concentrations of 50 and 100  $\mu$ M (Figure 7-B and C), may be related to toxic effects in the intestine, which is the main target of toxic synthetic or biological substances (Shao et al., 2012). A factor associated with darkening of the middle and posterior intestine is melanization, which is caused by a cascade of phenoloxidase in response to tissue damage in this organ (Silva et al., 2000). It is also possible that the extrusion of peritrophic matrix, along with intestinal contents, as a physiological response to toxicity, may be responsible for the deposition of dark material in the structure of the anal lobe gills. Such observations have previously been described in bioassays involving *Ae. aegypti* larvae exposed to the extract of *Magonia pubescense* (Arruda et al., 2003, Valotto et al., 2010). A more detailed investigation would be necessary to characterize the factors that led to the appearance of dark spots in the thorax structure of the anal lobe of larvae exposed to 200  $\mu$ M of etoposide (Figure 7-D, E and F), as well as etoposide's effects on incomplete metamorphosis of the pupae, which lacked proper

folding of the body segments that is necessary for adequate fluctuation at this stage of development (Figure 8-B, C and D).

Finally, we can say that inhibition of type II topoisomerase action with etoposide does not lead to immediate death of the vector, *Ae. aegypti*, even in the highest concentrations tested. Thus, we suggest that the interruption of cell division may have been responsible for the different phenotypes observed. The mild effect on mortality of larvae is an interesting observation, since etoposide is a classical inducer of cell death due to induction of apoptosis, as seen in mammalian cells (Xiao et al., 2014, Lee et al., 2017, Hevener et al., 2018, Qiu et al., 2019). Thus, detailed investigations of the effects of etoposide on mosquito cell lines will be necessary in order to better understand the dynamics of type II topoisomerase inhibition at the cellular level, since entire organisms, such as larvae, are subject to several simultaneous biological factors during the bioassay.

In conclusion, it is plausible that the mechanism responsible for the developmental arrest promoted by etoposide relies on interference with cell proliferation (or endoreduplication events), potentially explaining the observed compromised larval and pupal growth that occurs following etoposide treatment. Although detailed studies on the structure of AeTopII, as well as its effects on mosquito cell physiology, are still needed, our results indicate that AeTopII should be considered as a promising molecular target for the development of new bioactive molecules against *Ae. Aegypti*. Furthermore, the effects of etoposide over insect development indicates that this drug can be used as a starting point for the rational design of specific inhibitors of *Ae. aegypti* type II DNA topoisomerase.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Scientific Research Projects of the Federal University of Rio de Janeiro. Therefore, we thank NUPEM - Institute of Biodiversity and Sustainability, Federal University of Rio de Janeiro, Macaé-RJ, Brazil, CNPq, CAPES and FAPERJ.

#### References

- Akimitsu, N., Adachi, N., Hirai, H., Hossain, M.S., Hamamoto, H., Kobayashi, M., Aratani, Y., Koyama, H., Sekimizu, K. 2003. Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase II $\alpha$ . *Genes Cells* 8, 393-402.
- Arruda, W., Oliveira, G.M., Da Silva, I.G. 2003. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 17-25.
- Ayorinde, A., Oboh, B., Oduola, A., Otubanjo, O. 2015. The insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in farm and nonfarm sites of Lagos State, Nigeria. *J. Insect. Sci.* 15, 75.
- Bandle, O.J., Osheroff, N. 2008. The efficacy of topoisomerase II-targeted anticancer agents reflects the persistence of drug-induced cleavage complexes in cells. *Biochemistry* 47,

11900-11908.

Basile, R. 1969. Nucleic acid synthesis in nurse cells of *Rhynchosciara angelae* (Nonato and Pavan, 1951). *Genetics* 61, suppl.1, 261-273.

Bergerat, A., De Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, U.M., Forterre, P. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414-417.

Bjornsti, M.A., Kaufmann, S.H. 2019. Topoisomerases and cancer chemotherapy: recent advances and unanswered questions. *F1000Res.* 8, a.1704.

Blomme, T., Vandepoele, K., De Bodt, S., Simillion, C., Maere, S., Van De Peer, Y. 2006. The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution. *Genome Biol.* 7, r43.

Briegel, H., Gut, T., Lea, A.O. 2003. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Physiol.* 49, 249-260.

Champoux, J.J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369-413.

Cheesman, S.J. 2000. The topoisomerases of protozoan parasites. *Parasitol. Today* 16, 277-281.

Cho, K.H., Raikhel, A.S. 2001. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Insect. Mol. Biol.* 10, 455-474.

Clements, A.N. 1963. The physiology of mosquitoes: international series of monographs on pure and applied biology: Zoology vol. 17. 1st ed. The Macmillan Company, New York.

D'atanasio, N., Capezzone De Joannon, A., Di Sante, L., Mangano, G., Ombrato, R., Vitiello, M., Bartella, C., Magarò, G., Prati, F., Milanese, C., Vignaroli, C., Di Giorgio, F.P., Tongiani, S. 2020. Antibacterial activity of novel dual bacterial DNA type II topoisomerase inhibitors. *PLoS One* 15, e0228509.

De Campos Nebel, M., Palmittelli, M., González-Cid, M. 2017. Measurement of drug-stabilized topoisomerase II cleavage complexes by flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* 81, 7.48.1-7.48.8.

Dehal, P., Boore, J.L. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* 3, e314.

Fontenille, D., Powell, J.R., 2020. From anonymous to public enemy: how does a mosquito become a feared arbovirus vector? *Pathogens* 9, 265.

Hande, K.R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 34, 1514-1521.

Hansen, I.A., Attardo, G.M., Park, J.H., Peng, Q., Raikhel, A.S. 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10626-10631.

Hevener, K., Verstak, T.A., Lutat, K.E., Riggsbee, D.L., Mooney, J.W. 2018. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* 8, 844-861.

Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., Botstein, D. 1985. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553-563.

Hooper, D.C., Jacoby, G.A. 2016. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025320.



- Hughes, S.E.; Hawley, R.S. 2014. Topoisomerase II is required for the proper separation of heterochromatic regions during *Drosophila melanogaster* female meiosis. PLoS Genet. 10, e1004650.
- Juhn, J., James, A.A. 2006. *Oskar* gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 15, 363-372.
- Juhn, J., James, A.A. 2012. Hybridization *in situ* of salivary glands, ovaries, and embryos of vector mosquitoes. J. Vis. Exp. 64, 3709.
- Kelly, J.M., McRobert, L., Baker, D.A. 2006. Evidence on the chromosomal location of centromeric DNA in *Plasmodium falciparum* from etoposide-mediated topoisomerase-II cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 6706-6711.
- Kolarič, A., Anderluh, M., Minovski, N. 2020. Two decades of successful SAR-grounded stories of the novel bacterial topoisomerase inhibitors (NBT's). J. Med. Chem. 63, 5664-5674.
- Kumar S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. *MEGA X*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35, 1547-1549.
- Lee, S.Y., Kim, J.Y., Jung, Y.J., Kang, K. 2017. Toxicological evaluation of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in the model animal *Caenorhabditis elegans* and 3T3-L1 normal murine cells. Environ. Toxicol. 32, 1836-1843.
- Lima, C.D., Wang, J.C., Mondragon, A. 1994. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase. Nature 367, 138-146.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  method. Methods 25, 402-408.
- Misra-Bhattacharya, S., Katiyar, D., Bajpai, P., Tripathi, R.P., Saxena, J.K. 2004. 4-Methyl-7-(tetradecanoyl)-2H-1-benzopyran-2-one: a novel DNA topoisomerase II inhibitor with adulticidal and embryostatic activity against sub-periodic *Brugia malayi*. Parasitol. Res. 92, 177-182.
- Moyes, C.L., Vontas, J., Martins, A.J., Ng, L.C., Koou, S.Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J.P., Weetman, D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0005625.
- Mudeppa, D.G., Kumar, S., Kokkonda, S., White, J., Rathod, P.K. 2015. Topoisomerase II from human malaria parasites: expression, purification, and selective inhibition. J. Biol. Chem. 290, 20313-20324.
- Nitiss, J.L., Beck, W.T. 1996. Antitopoisomerase drug action and resistance. Eur. J. Cancer 32A, 958-966.
- Poltronieri, P., Yokota, T., Koyama, Y., Hanai, S., Uchida, K., Miwa, M. 1997. PARP cleavage in the apoptotic pathway in S2 cells from *Drosophila melanogaster*. Biochem. Cell Biol. 75, 445-449.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H.L., Marchand, C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drug. Chem. Biol. 17, 421-433.
- Prachumwat, A., Li, W.H. 2008. Gene number expansion and contraction in vertebrate genomes with respect to invertebrate genomes. Genome Res. 18, 221-232.
- Qiu, Z., Lin, A., Li, K., Lin, W., Wang, Q., Wei, T., Zhu, W., Luo, P., Zhang, J. 2019. A novel mutation panel for predicting etoposide resistance in small-cell lung cancer. Drug Des. Devel.

Ther. 13, 2021-2041.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.

Shaiu, W.L., Hu, T., Hsieh, T.S. 1999. The hydrophilic, protease-sensitive terminal domains of eukaryotic DNA topoisomerases have essential intracellular functions. *Pac. Symp. Biocomput.* 1999, 578-589.

Shao, Q., Yang, B., Xu, Q., Li, X., Lu, Z., Wang, C., Huang, Y., Söderhäll, K., Ling, E. 2012. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J. Biol. Chem.* 287, 14270-14279.

Shapiro, T.A., Showalter, A.F. 1994. *In vivo* inhibition of trypanosome mitochondrial topoisomerase II: effects on kinetoplast DNA maxicircles. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5891-5897.

Silva, C., Gary, B.D., Rau, M.E. 2000. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 367-379.

Taracena, M.L., Bottino-Rojas, V., Talyuli, O.A.C., Walter Nuno, A.B., Oliveira, J.H.M., Angleró-Rodríguez, Y.I., Wells, M.B., Dimopoulos, G., Oliveira, P.L., Paiva-Silva, G.O. 2018. Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006498.

Topcu, Z. 2001. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J. Clin. Pharm. Ther.* 26, 405-416.

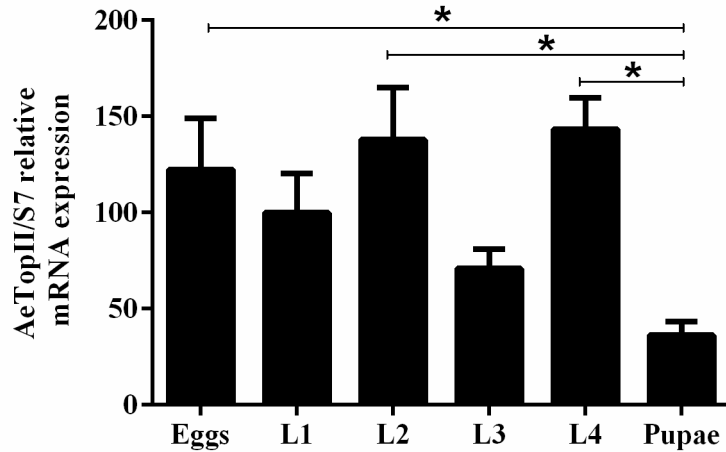
Valotto, C.F., Silva, H.H., Cavasin, G., Silva, H.H.G., Geris, R., Da Silva, I.G. 2010. Morpho-histological changes in *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) caused by the catechical tanine isolated from the cerrado plant *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *J. Trop. Pathol.* 39, 309-321.

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

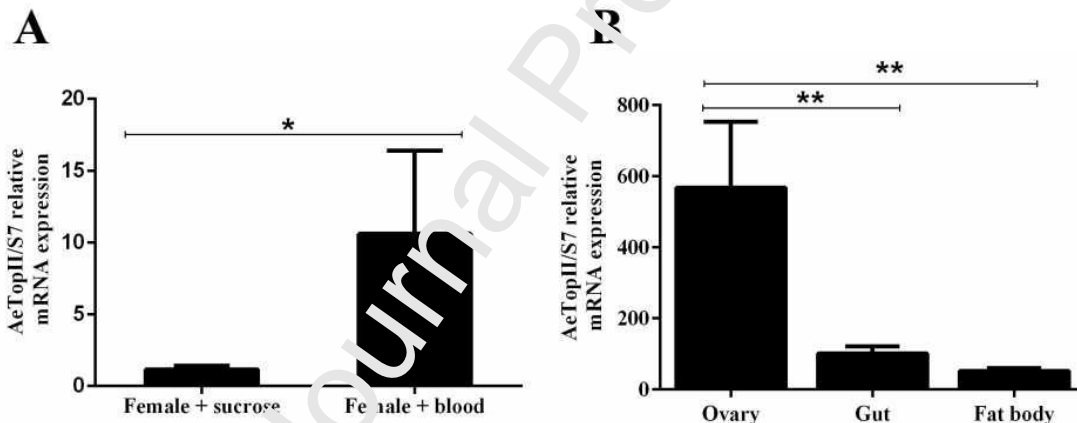
World Health Organization (WHO). 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO Press, Geneva.

Wu, C.C., Li, T.K., Farh, L., Lin, L.Y., Lin, T.S., Yu, Y.J., Yen, T.J., Chiang, C.W., Chan, N.L. 2011. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* 333, 459-462

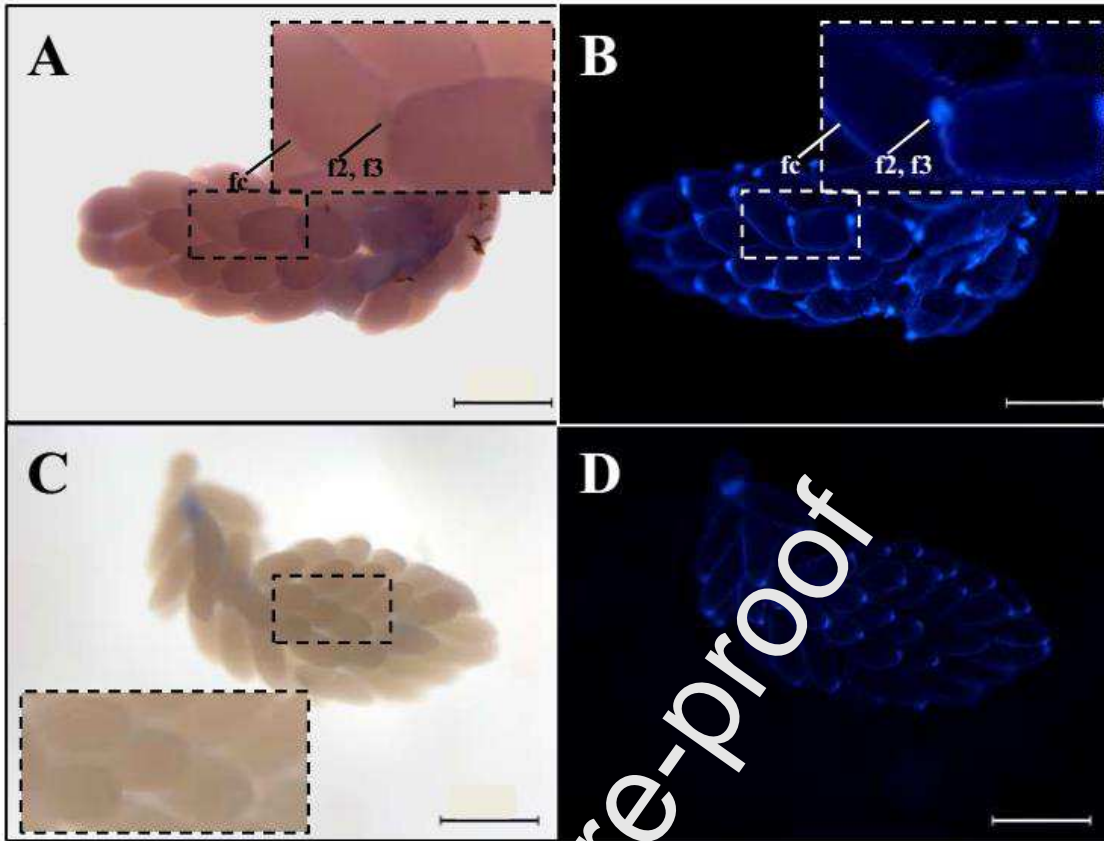
Xiao, L., Zhao, W., Li, H.M., Wan, D.J., Li, D.S., Chen, T., Tang, Y.J. 2014. Design and synthesis of the novel DNA topoisomerase II inhibitors: esterification and amination substituted 4'-demethylepipodophyllotoxin derivatives exhibiting anti-tumor activity by activating ATM/ATR signaling pathways. *Eur. J. Med. Chem.* 80, 267-277.



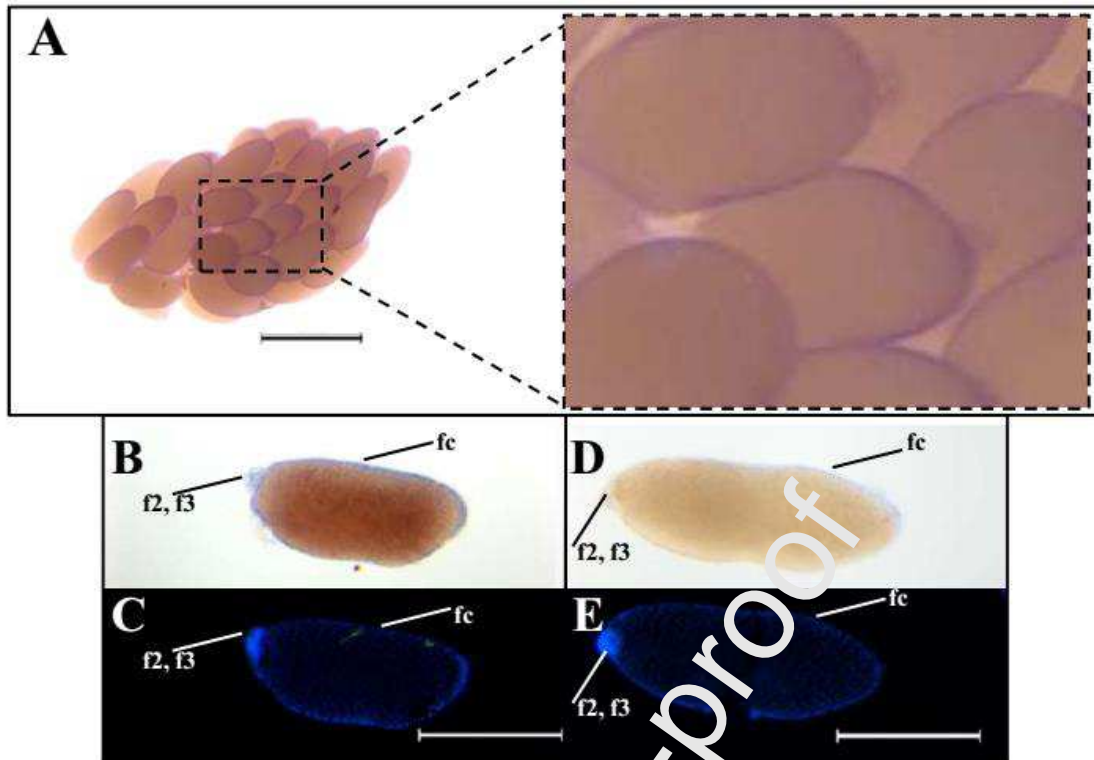
**Figure 1. Relative expression of AeTopII mRNA in the early stages of *Ae. aegypti* life cycle.** Total RNA samples from eggs, L1 to L4 larvae and pupae were submitted to RT-qPCR and analysed by the  $2^{-\Delta Cq}$  method, using the S7 ribosomal protein mRNA as a reference of expression. Data are represented as the means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments and are expressed in arbitrary units of relative expression. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test. \*  $p \leq 0.05$ .



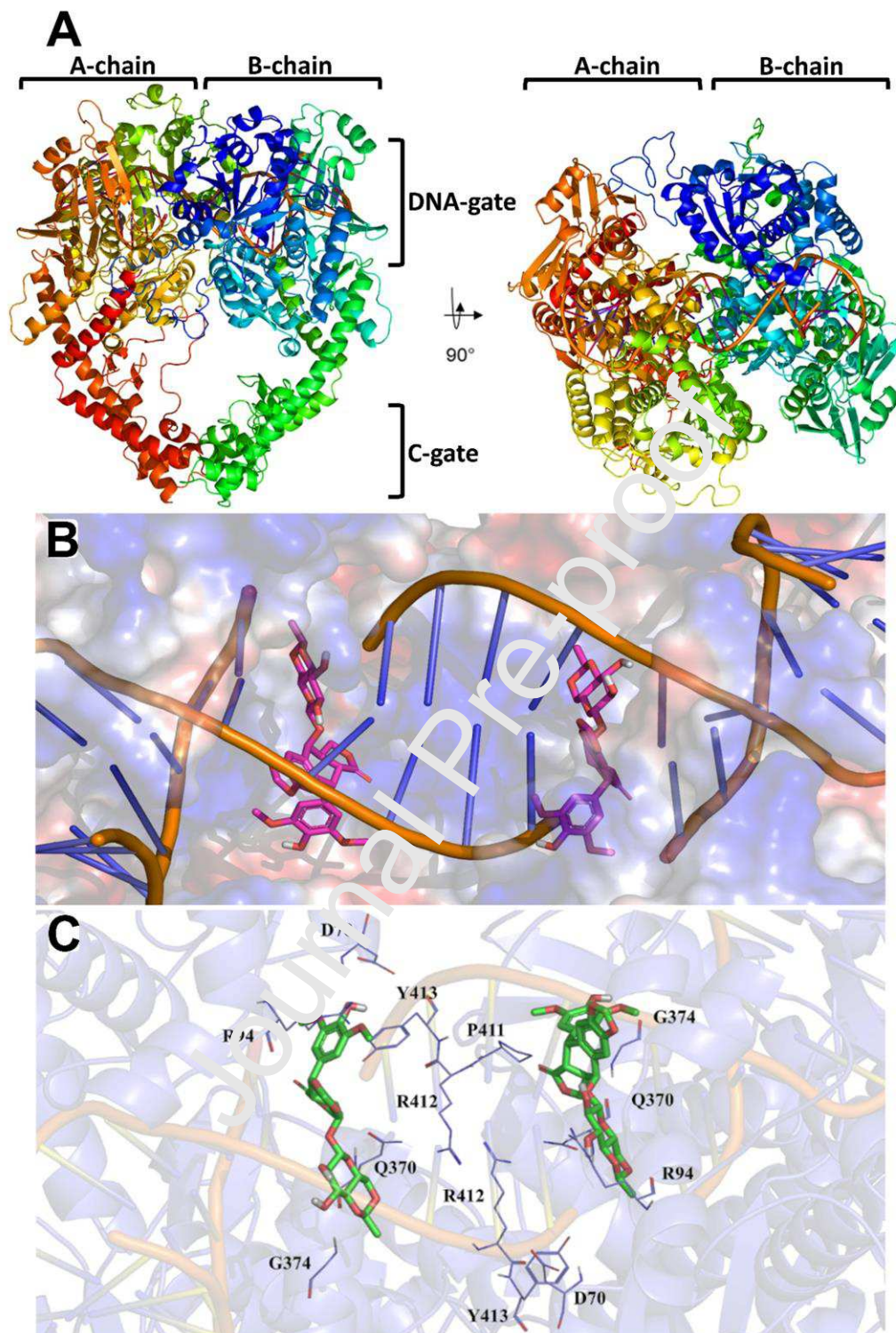
**Figure 2. Relative expression of AeTopII mRNA in adult *Ae. aegypti* females.** (A) Relative expression of AeTopII mRNA in adult females fed with sucrose and after 48 hours of blood feeding. (B) Relative expression of AeTopII mRNA in three major organs (ovary, intestine and fat body) of blood-fed females. Total RNA samples were submitted to RT-qPCR and analysed by the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (A) or  $2^{-\Delta Cq}$  (B) methods, using the S7 ribosomal protein mRNA as a reference of expression. Data are represented as the mean  $\pm$  standard deviations of three independent experiments and expressed as fold change of calibrator expression (sucrose-fed females) (A) or arbitrary units of relative expression (B). Statistical analysis was performed using unpaired t test (A) and one-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test (B). \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .



**Figure 3.** *In situ* hybridization of AeTopII mRNA in the ovaries of *Ae. aegypti* blood-fed females. A and C: Bright field images of ovaries stained with the AeTopII probe and antisense control probe, respectively. Positive signals in hybridizations are shown in purple. B and D: Nuclear fluorescence (DAPI stain) of the same fields shown in A and B, respectively. Ovaries were obtained 36 hours after blood feeding. fc: follicular epithelial cells; f2,f3: secondary and tertiary follicles. Scale bars: 0.5 mm.

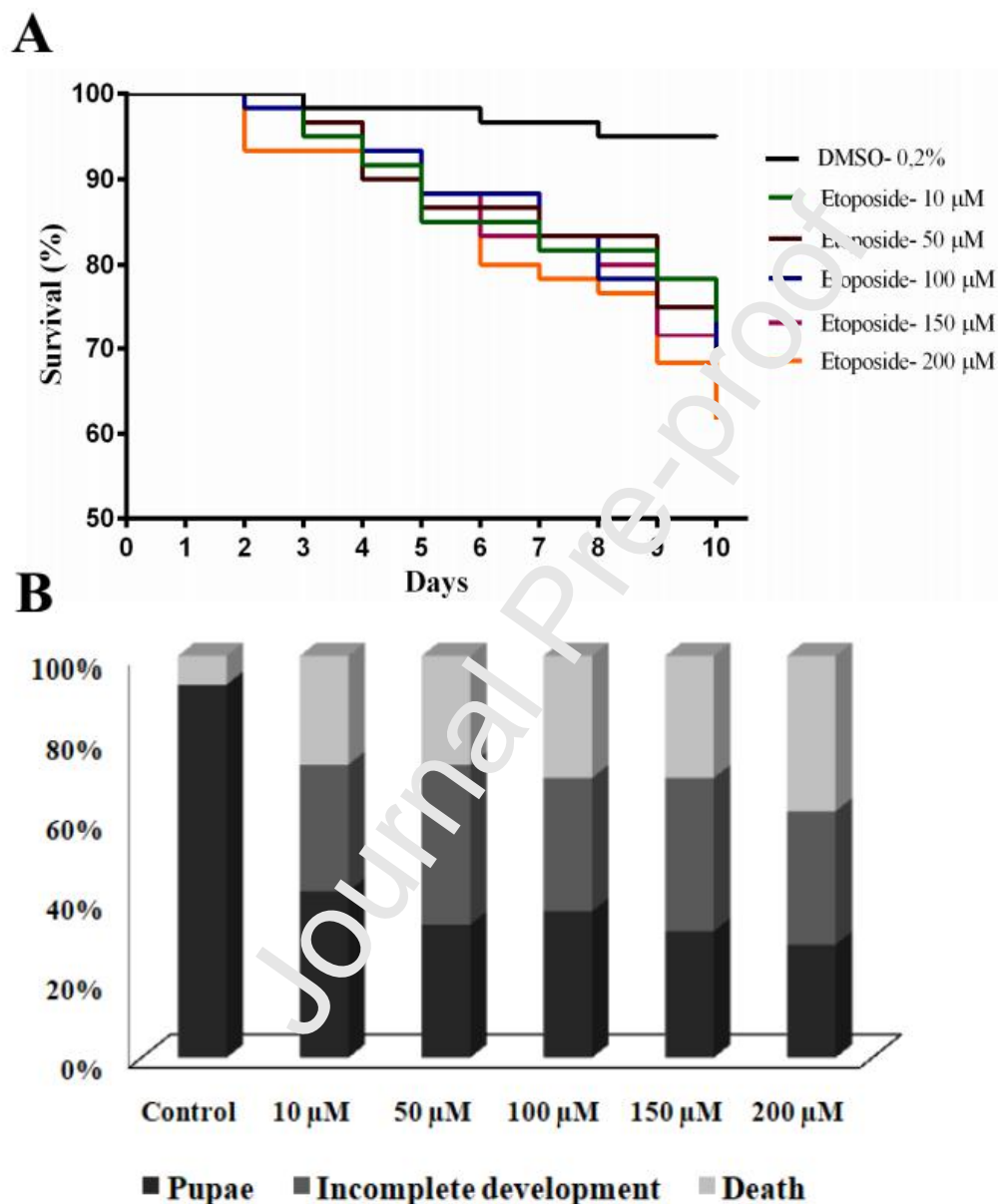


**Figure 4.** *In situ* hybridization of AeTopII mRNA in the ovarian follicles of blood-fed *Ae. aegypti* females. A: Greater magnification showing of the antisense probe on follicular cells. B and D: Bright field images of ovaries stained with the AeTopII probe and antisense control probe, respectively. Positive signal in hybridizations are shown in purple. C and E: Nuclear fluorescence (DAPI stain) of the same fields shown in B and D, respectively. Ovarian follicles were obtained by dissecting ovaries obtained 36 hours after blood feeding. fc: follicular epithelial cells; f2, f3: secondary and tertiary follicles. Scale bars: 0.5 mm (A) and 0.2 mm (C and E).

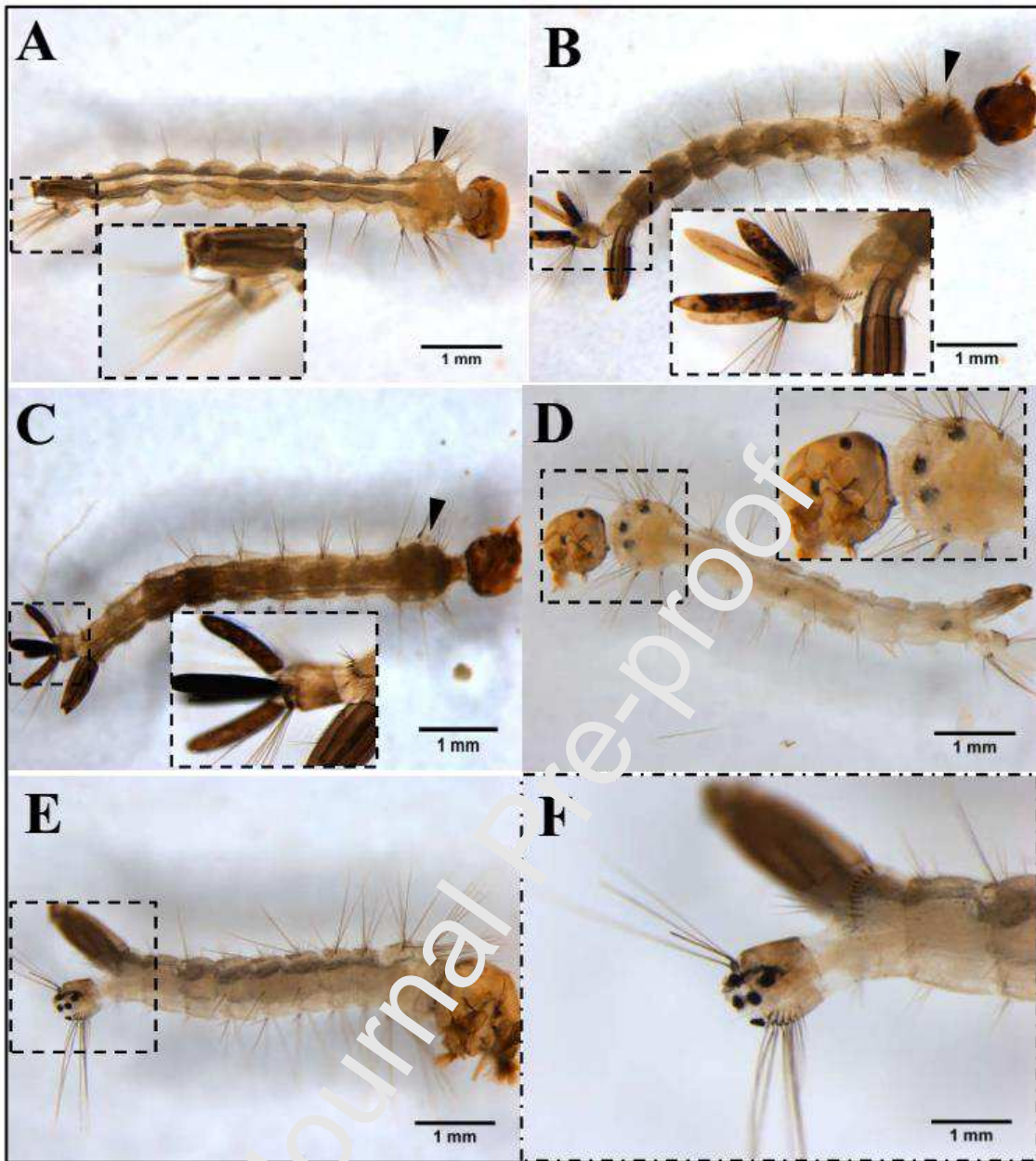


**Figure 5.** Homology based model of AeTopII and molecular docking with etoposide. A: Frontal (left) and top views (right) of AeTopII dimer (A and B chains) displayed in ribbon representation. Human TopII- $\beta$  (PDB ID: Q3X3) was used as template for modelling and enzyme-bound DNA is depicted in orange. Positions of DNA-gate and C-gate are indicated. B: Representation of etoposide docking in the predicted binding site of the AeTopII model.

The electrostatic potential surface of the enzyme is shown on background and DNA chains are represented in orange and blue sticks. C: Representation of the amino acid residues from AeTopII model which are predicted to interact with etoposide in the docking assay. Images in A and B correspond to the pose with the highest score in docking analysis. Molecular structures were visualized with PyMOL (v.2.4.0a0) and BIOVIA Discovery Studio (v.16.1.0.15350).

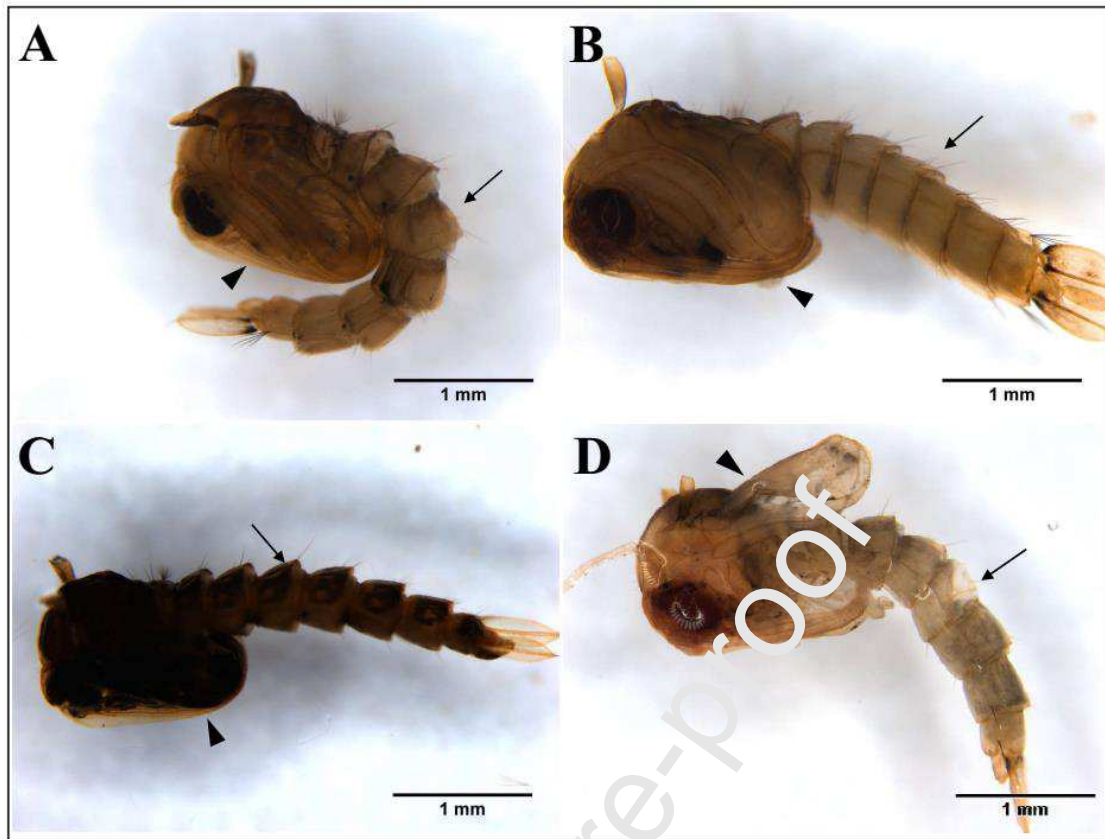


**Figure 6. Bioassay of *Ae. aegypti* larvae exposed to etoposide.** A: Kaplan-Meier survival plot of the bioassay with increasing concentrations of the topoisomerase II inhibitor, etoposide. Control larvae were exposed to 0.2% DMSO. The Mantel-Cox Log-rank test indicates a significant difference between the curves ( $p = 0.01$ ) and the Log-rank test for trend indicates a significant dose effect between treatments ( $p = 0.0006$ ). B: Proportion of observed outcomes for *Ae. aegypti* larvae in the 10<sup>th</sup> day of etoposide treatment. Data are presented as a pool of 3 replicate bioassays, with a total of 60 2<sup>nd</sup> stage larvae for each treatment.

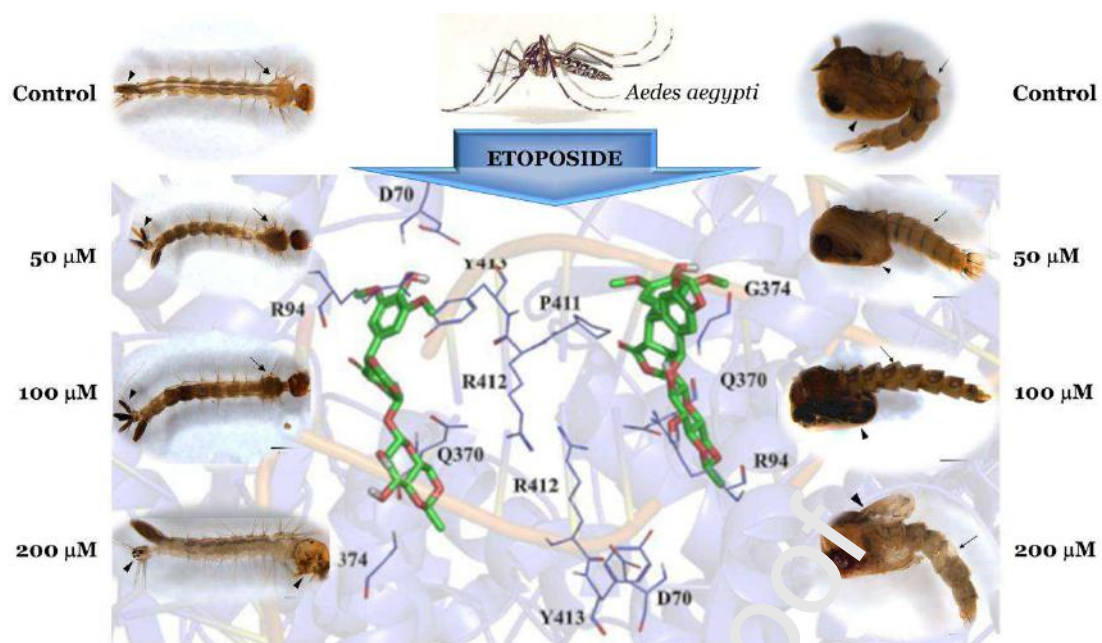


**Figure 7. Morphology of *Ae. aegypti* larvae after 10 days of exposure to etoposide.** A: Control larvae submitted to treatment with 0.2% DMSO. Pigmentation and body anatomy are typical of the 4<sup>th</sup> stage of development. B and C: Larvae exposed to 50 and 100  $\mu\text{M}$  of etoposide, respectively. Dark pigmentation is seen throughout the body and in the gills (insets). D and E: Larvae exposed to 200  $\mu\text{M}$  of etoposide. The body displays lighter pigmentation, with dark spots on the thorax (inset in D) and loss of the anal lobe (E and F inset). Arrowheads indicate the region of the thorax in the larva. Scale bars: 1.0 mm. The images are representative of 3 independent experiments and were acquired with a Leica stereoscopic microscope, model M205.





**Figure 8. Pupae (side view) of *Ae. aegypti* formed during exposure to etoposide.** A: Control pupa with normal development of its structures, normal pigmentation and typical curvature with a “comma” morphology. B: Representative pupa formed during exposure to 50  $\mu\text{M}$  of etoposide, with absence of the typical curvature of segments. C: Representative pupa formed during exposure to 100  $\mu\text{M}$  of etoposide, showing dark pigmentation throughout the body and absence of typical curvature. D: Representative pupa formed during exposure to 200  $\mu\text{M}$  of etoposide, showing anomalous differentiation in the 3<sup>rd</sup> abdominal segment and the cephalothorax. Arrows point to the 3<sup>rd</sup> abdominal segment and arrowheads point to the cephalothorax (anterior region). Scale bars: 1.0 mm. The images were acquired with a Leica stereomicroscope, mode M205.



### Highlights

- Etoposide reduces the survival of *Ae. aegypti* larvae;
- Etoposide induces morphological changes in *Ae. aegypti* larvae and pupae;
- AeTopII mRNA is expressed at all stages of the *Ae. aegypti* life cycle;
- In the ovaries, the AeTopII mRNA is more expressed in follicular cells

Journal Pre-proof