

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Wesley Roger Rodrigues Ferreira

**INVESTIGAÇÃO DO REPARO DE DNA ACOPLADO AO PROCESSO DE  
TRANSCRIÇÃO E RECOMBINAÇÃO NA MITOCÔNDRIA DO *Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte  
2024

Wesley Roger Rodrigues Ferreira

**INVESTIGAÇÃO DO REPARO DE DNA ACOPLADO AO PROCESSO DE  
TRANSCRIÇÃO E RECOMBINAÇÃO NA MITOCÔNDRIA DO *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Carlos Renato Machado

Belo Horizonte  
2024

043

Ferreira, Wesley Roger Rodrigues.

Investigação do reparo de DNA acoplado ao processo de transcrição e recombinação na mitocôndria do *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Wesley Roger Rodrigues Ferreira. – 2024.

189 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Renato Machado.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Doença de Chagas. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Reparo do DNA. 5. Mitocôndrias. I. Machado, Carlos Renato. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE WESLEY ROGER RODRIGUES FERREIRA.** Aos vinte e oito dias do mês de junho de 2024 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Investigação do reparo de DNA acoplado ao Processo de Transcrição e Recombinação na Mitocôndria do Trypanosoma Cruzi”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto (Universidade de São Paulo), aprovado; Dr. Marcelo Santos Da Silva (Universidade de São Paulo), aprovado; Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhaes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO


REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de junho de 2024.


**Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto (USP)**

Documento assinado digitalmente  
 NADJA CRISTHINA DE SOUZA PINTO  
 Data: 28/06/2024 18:52:34-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Dr. Marcelo Santos Da Silva (USP)**

Documento assinado digitalmente  
 MARCELO SANTOS DA SILVA  
 Data: 28/06/2024 19:51:38-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)**

Documento assinado digitalmente  
 ERICH BIRELLI TAHARA  
 Data: 03/07/2024 07:44:33 0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhaes (UFMG)**

Documento assinado digitalmente  
 MARIANA TORQUATO QUEZADO DE MAGALHAE  
 Data: 11/07/2024 18:40:50-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)**

Documento assinado digitalmente  
 CARLOS RENATO MACHADO  
 Data: 14/07/2024 16:17:46-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

*In memoriam* de Olivia Torquato de Jesus – “O conhecimento é a única coisa que ninguém pode te roubar, a única coisa que ninguém pode tirar de você...” – Kaique William de Souza.

## AGRADECIMENTOS

Para a construção e realização desta tese, algumas pessoas me ajudaram, sem as quais não teria sido possível chegar aonde cheguei. A conquista desta tese representa o esforço de uma luta, uma batalha e a realização de um sonho, não apenas meu, mas de todas essas pessoas que acreditaram e confiaram em mim. A todos vocês, às quais seria exaustivo enumerar aqui, a minha profunda gratidão.

A algumas delas pelo apoio que me prestaram a esse trabalho, gostaria de agradecer especialmente.

Primeiramente, ao Professor Dr. Carlos Renato Machado, que me aceitou como orientando desde o mestrado, pelos ensinamentos, discussões, orientações e puxões de orelha. Foram quase 7 anos de convivência, o entusiasmo dele pela ciência e conhecimento, sua dedicação em ensinar, não apenas chamaram minha atenção, mas também a de todos os alunos que o conhecem. No laboratório, a convivência, apoio, compreensão e os diversos “E aí?”, “O que deu?” me ensinaram e estimularam a sempre correr atrás e ficar cada vez mais intrigado com o conhecimento. Outra coisa que nunca sairá da minha cabeça é como ele sempre nos escutou e nos tratou igualmente. Obrigado por ter acreditado em mim, principalmente nesse final, onde nem mesmo eu acreditava. Obrigado por me estimular a continuar na carreira científica, por ter me ajudado quando as coisas ficaram ruins, por ter me dado esta oportunidade única na minha vida e por ter me ensinado coisas que vão além do conhecimento científico. Sou extremamente grato. Seu exemplo como pesquisador e pessoa me ensinou a ser uma pessoa melhor.

Ao Bruno Marçal Repolês que me ajudou, ensinou e incentivou a discutir resultados constantemente, mesmo à distância, tornando-se um dos meus melhores amigos, até porque é o amigo que compartilha o amor por reparo de DNA em mitocôndrias comigo, além do amor pelo videogame, jogos e todas essas coisas nerds que a gente curte. Fico muito feliz por ter tido a oportunidade de te conhecer e levar isso por toda a vida.

Agradeço aos professores do Laboratório por todas as sugestões e ajuda no decorrer deste projeto, Prof. Dr. Glória Regina Franco e Profa. Andrea Mara Macedo, assim como o Prof. Dr. Erich Birelli Tahara, que me mostraram que "cada resposta apenas instiga novas perguntas".

Aos meus amigos do Grupo de Reparo, aos atuais e aos antigos, aqueles que conviveram comigo todos esses tempos árduos, alguns dos quais me ajudaram a superar um governo negacionista e uma pandemia: Antônio, Augusto, Héllida, Veronica, William, Amanda, Adalberto, Bruno Rezende, Darlan, Alice, Livia. Em especial ao Darlan que foi meu primeiro IC, e se tornou um grande amigo.

Aos gloriosos, em especial à Daniela de Laet, Freddy, Iza, Amanda (Erich) e Jéssica Duarte. À Jéssica, que me acompanha desde a graduação e está sempre ali para me escutar, assim como todos os demais alunos do LGB durante todos esses anos.

Agradeço à equipe do GIZ, aos que estiveram no início e aos que estão agora, em especial à Rafaela, Marcos, Kenia, Zulmira, Patrícia, Izabela, que tanto nos ensinam. Foi uma das melhores experiências e, sem dúvida alguma, o grande diferencial na minha formação.

Agradeço à equipe do NAPg, em especial a Rose, Prof. Erika e Prof. Gloria. A Rose me ensinou muitas coisas, principalmente sobre organização e responsabilidade. Obrigado por toda a oportunidade e aprendizado.

A todos os funcionários que me ajudaram neste processo, especialmente à Gislene, Renata, Alexandre, e em memória ao Grande secretário Orlando, que perdemos na pandemia. À técnica Lorrane, por colocar ordem no laboratório e nos aguentar no dia a dia, sendo também uma grande amiga.

A outros amigos que foram extremamente importantes. Agradeço ao meu grande amigo de infância, Sandro, que sempre esteve presente me ouvindo e mostrando pontos diferentes. Agradeço à minha amiga de graduação, Fabi. Agradeço a Beatriz K, que me ajudou muito na reta final, discutindo e me estimulando, sou muito grato a vocês.

Agradeço a Rachel, que foi de extrema importância em vários momentos do desenvolvimento desta tese, ajudando-me em muitos momentos, incentivando e estimulando. Esta tese também é uma conquista sua!

Agradeço aos meus familiares. Em especial às pessoas a quem devo tudo, meu Pai Daniel, minha Mãe Beatriz, meu irmão Werner, minha madrinha Edna e meu Padrinho Donizete, por todo sacrifício, apoio e suporte: eu nunca poderei agradecer o suficiente. Sempre fui de uma família humilde, e chegar aonde cheguei não foi fácil, foi uma luta diária por oportunidades! Minha família é a base, e a luta diária é por vocês, em especial por você, mãe, que é a minha vida, e eu só posso agradecer por todo seu sacrifício que teve em me criar, saiba

que valeu a pena e vou sempre te recompensar por tudo que fez! Gostaria de agradecer em memória a minha avó Olivia, que mesmo sendo filha de professores não pode estudar por ser mulher, mas foi a minha maior inspiração e meu maior orgulho. Que sempre se orgulhou pelo primeiro neto fazendo Doutorado.

Agradeço a Patrícia, que me adotou em sua casa, foi uma mãe para mim. Não tenho palavras para descrever todo o carinho e o que você fez por mim. Sem você, não teria chegado aqui.

Quero agradecer profundamente à minha namorada Dhiovana, que, apesar de não estar presente desde o início dessa jornada, foi essencial para que eu chegasse ao final. Seu apoio, incentivo e confiança em mim me fizeram acreditar que sou capaz de muitas coisas. Sem você, eu não teria conseguido. Obrigado por estar ao meu lado, por me impulsionar a seguir em frente e a acreditar nos meus sonhos, até nos momentos em que mais duvidei de mim mesmo. Obrigado por estar comigo nessa conquista e nas que virão.

Isaac Newton já dizia: 'Se cheguei até aqui, foi porque me apoiei no ombro de gigantes'. Essa frase não fala apenas sobre ciência, e hoje eu entendo isso.

Agradeço, do fundo do meu coração, a todos vocês!

*"Eu prefiro ter perguntas que não podem ser respondidas a ter respostas que não podem ser questionadas". - Richard Feynman, (s.d.)*

## RESUMO

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, pertence à ordem Kinetoplastida, possuindo uma mitocôndria. Embora existam evidências da presença de vias de reparo no DNA mitocondrial (kDNA) de *T. cruzi*, as proteínas envolvidas nesse processo ainda não são totalmente conhecidas. Investigamos o papel das proteínas Rad51 atuante no reparo por recombinação homóloga (HR) e Topo3 $\alpha$  que processa as junções de *holliday* na HR, da proteína CSB, envolvida no reparo por excisão de nucleotídeos associado à transcrição (TC-NER), e da proteína KAP7, que faz parte de uma família de proteínas exclusivas de tripanossomatídeos associadas ao metabolismo do kDNA. Em busca de evidências da HR mitocondrial utilizamos mt-Dox, um agente genotóxico que induz a formação de quebras de fita dupla nas mitocôndrias, após 24 horas observamos uma sensibilidade nas células heminocutes de TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) e nocautes de Topo3 $\alpha$ . Quando expostas ao mesmo agente genotóxico essas células interromperam seu crescimento, esses dados mostram essas proteínas apresentam uma resposta diferenciada aos danos no DNA entre núcleo e mitocôndria. Ao tratar as células TcRad51<sup>+/-</sup> com cisplatina, observamos uma sensibilidade nessas células, e a PCR quantitativa de lesões revelou que as células TcRad51<sup>+/-</sup> apresentam mais danos no kDNA. Evidenciando, assim, que está envolvida no reparo de lesões de recombinação nesse organismo. No estudo da proteína CSB na mitocôndria, constatamos que o CSB atua no reparo mitocondrial em lesões que levam a parada do processo transcricional. Demonstramos que lesões geradas por UV-C e cisplatina, são reparadas rapidamente no kDNA com o envolvimento de CSB. A sua superexpressão acelerou o reparo, enquanto a sua depleção prolongou a presença dessas lesões. A utilização da droga mitocondrial mt-Dox evidenciou uma sinalização distinta do CSB no núcleo e na mitocôndria, sendo que a sinalização mitocondrial pode ser revertida pela inibição de quinases envolvidas na DDR. Além disso, demonstramos que a deficiência de CSB tem impacto negativo na transcrição mitocondrial. Ao estudar a proteína KAP7, coletamos evidências do seu envolvimento ao processo de resposta ao dano no DNA mitocondrial. Os resultados sugerem que TcRad51 e TcTopo3 $\alpha$  estão envolvidos no reparo por recombinação homóloga mitocondrial, e indicam o envolvimento de TcCSB no reparo transcricional mitocondrial. Esses dados apontam para a existência de uma via de reparo de DNA mitocondrial associada à transcrição, diferindo dos demais organismos e, possivelmente, relacionada à presença de uma única mitocôndria. Além disso, observamos uma sinalização mitocondrial diferenciada do núcleo quando a célula sofre lesões exclusivamente nessa organela.

Palavras-chave: Doença de chagas; Reparo de DNA; Mitocôndrias; *T. cruzi*

## ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas Disease, belongs to the Kinetoplastida order and possesses a unique and elongated mitochondrion. Although there is evidence of the presence of DNA repair pathways in the mitochondrial DNA (kDNA) of *T. cruzi*, the proteins involved in this process are not fully understood. In this study, we investigated the role of Rad51 proteins involved in the initiation of homologous recombination (HR) repair, Topo3 $\alpha$  processing holliday junctions in HR, CSB protein involved in transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER), and KAP7 protein, part of a unique family of trypanosomatid proteins associated with kDNA metabolism. In the search for evidence of mitochondrial HR, we used mt-Dox, a genotoxic agent inducing double-strand breaks in mitochondria. We observed sensitivity after 24 hours in TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) heminocaut cells and Topo3 $\alpha$  knockouts exposed to the same genotoxic agent. These cells ceased their growth, indicating that these proteins not only play a role in mitochondrial repair but also exhibit a differentiated response in DNA damage response (DDR) between the nucleus and mitochondria. Treating TcRad51<sup>+/-</sup> cells with cisplatin revealed sensitivity, and quantitative PCR of lesions showed more damage in kDNA. This indicates involvement in recombination repair in this organism. In the study of CSB protein function in the mitochondria, we found that CSB is involved in mitochondrial repair for lesions causing transcriptional arrest. We demonstrated that lesions generated by UV-C and cisplatin, typically repaired by TC-NER, are rapidly repaired in kDNA with CSB involvement. CSB overexpression accelerated repair, while depletion prolonged the presence of these lesions. Using the mitochondrial drug mt-Dox revealed distinct CSB signaling in the nucleus and mitochondria, with mitochondrial signaling reversible by nonspecific inhibition of DDR-involved kinases. Furthermore, we showed that CSB deficiency negatively impacts mitochondrial transcription after cisplatin exposure. Studying KAP7 protein, we collected evidence of its involvement in the mitochondrial DNA damage response. The results suggest that TcRad51 and TcTopo3 $\alpha$  are involved in mitochondrial homologous recombination repair, indicating TcCSB involvement in mitochondrial transcriptional repair. These data point to the existence of a transcription-associated mitochondrial DNA repair pathway, differing from other organisms and possibly related to the presence of a single mitochondrion. Additionally, we observed differentiated mitochondrial signaling from the nucleus when the cell exclusively undergoes lesions in this organelle.

Keywords: Chagas disease; DNA repair; Mitochondria; *Trypanosoma cruzi*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica mundial da doença de Chagas .....	17
<b>Figura 2</b> – Representação estrutural das 3 formas de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
<b>Figura 3</b> – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	21
<b>Figura 4</b> – Modelo de replicação do kDNA. ....	26
<b>Figura 5</b> – Modelo de replicação e divisão do kDNA. ....	28
<b>Figura 6</b> – Representação do maxicírculo e minicírculo do <i>T. cruzi</i> .....	31
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do complexo catalítico de edição de RNA (RECC) .....	33
<b>Figura 8</b> – Fontes de dano ao DNA e principais vias de reparo .....	38
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática simplificada do NER .....	42
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática simplificada da via de HR .....	45
<b>Figura 11</b> – Efeito da manutenção do DNA mitocondrial na homeostase mitocondrial .....	50
<b>Figura 12</b> – Cinética de reparo de lesões nDNA e kDNA em <i>T. cruzi</i> .....	51
<b>Figura 13</b> – Modificações no DNA causadas pela radiação UV .....	54
<b>Figura 14</b> – Danos causados pela exposição do DNA à cisplatina .....	56
<b>Figura 15</b> – Representação resumida de obtenção de mt-Dox .....	59
<b>Figura 16</b> – Imagens de fluorescência de <i>T. cruzi</i> tratados com Dox e Mt-Dox .....	71
<b>Figura 17</b> – Resposta a lesões causadas por Dox e mt-Dox em células WT e TcRAD51 <sup>+/-</sup> .....	73
<b>Figura 18</b> – Resposta a lesões causadas por cisplatina em células WT e TcRAD51 <sup>+/-</sup> .....	74
<b>Figura 19</b> – Cinética de reparo de lesões causadas por cisplatina em células WT e TcRad51 <sup>+/-</sup> .....	76
<b>Figura 20</b> – Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por Dox e mt-Dox em células WT, TcTopo3 $\alpha$ <sup>KO</sup> e TcTopo3 $\beta$ <sup>KO</sup> .....	79
<b>Figura 22</b> – Resposta a lesões causadas por mt-Dox em WT, TcCSB <sup>+/-</sup> , TcCSB <sup>+</sup> .....	82
<b>Figura 23</b> – Resposta a lesões causadas por Dox em células selvagens (WT), heminocautes de TcCSB (TcCSB <sup>+/-</sup> ), e superexpressora de TcCSB (TcCSB <sup>+</sup> ) .....	83
<b>Figura 24</b> – Gráfico de sobrevivência TcCSB <sup>+/-</sup> pré-tratados com cafeína e tratados com mt-Dox. ...	84
<b>Figura 25</b> – Curva e gráfico de sobrevivência de células WT, TcCSB <sup>+</sup> e TcCSB <sup>+/-</sup> tratadas com 1500 $\mu$ J/m <sup>2</sup> de UV-C .....	86
<b>Figura 26</b> – Cinética de reparo de lesões causadas por 1500 $\mu$ Jm <sup>-2</sup> UV-C em células WT, TcCSB <sup>+/-</sup> e TcCSB <sup>+</sup> .....	88
<b>Figura 27</b> – Curva e gráfico de sobrevivência como resposta de lesões causadas por 300 $\mu$ M de cisplatina em células WT, TcCSB <sup>+/-</sup> e TcCSB <sup>+</sup> de <i>T. cruzi</i> . ....	90
<b>Figura 28</b> - Cinética de reparo de lesões causadas por cisplatina em células WT, CSB <sup>+/-</sup> e CSB <sup>+</sup> .....	92
<b>Figura 29</b> – Expressão basal de genes mitocondriais em cepa WT, TcCSB <sup>+/-</sup> e TcCCSB <sup>+</sup> .....	94
<b>Figura 30</b> – Número de transcritos em situação de estresse com cisplatina em células WT, TcCSB <sup>+</sup> e TCSB <sup>+/-</sup> .....	96
<b>Figura 31</b> – Curva e gráfico de sobrevivência como resposta de lesões causadas por mt-Dox e Dox nas células WT e TcKap7 <sup>KO</sup> .....	98
<b>Figura 32</b> – Sobrevivência de TcKap7 <sup>KO</sup> após o tratamento com 300 $\mu$ M de cisplatina .....	99
<b>Figura 33</b> – Expressão basal de genes mitocondriais em células WT e TcKap7 <sup>KO</sup> .....	100
<b>Figura 34</b> – Número de transcritos em situação de estresse com cisplatina em células WT e TcKap7 <sup>KO</sup> .....	102
<b>Figura 35</b> – Resposta a lesões causadas por mt-Cbl em células TcRad51 <sup>+/-</sup> .....	107
<b>Figura 36</b> – Cinética de reparo mitocondrial de TcKap7 <sup>KO</sup> com cisplatina .....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>6-4PP</b>	Fotoproduto 6-4
<b>8oxoG</b>	8-oxoguanina
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutada
<b>ATR</b>	Ataxia Telangiectasia relacionada a Rad3
<b>BER</b>	Reparo por excisão de bases
<b>BZ</b>	Benzonidazol
<b>CAK</b>	Complexo ativador de cinase.
<b>COX2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>CPD</b>	Dímeros de ciclobutano
<b>CSA</b>	Síndrome de Cockayne proteína A
<b>CSB</b>	Síndrome de Cockayne proteína B
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DDR</b>	Resposta ao dano ao DNA
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>Dox</b>	Doxorrubicina
<b>DSB</b>	Quebras de fita dupla no DNA
<b>GG-NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeo – via global
<b>HR</b>	recombinação homóloga.
<b>ICL</b>	Ligação cruzadas entre o DNA
<b>KAP</b>	kinetoplasts-associated protein
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>KFZ</b>	Cinetoflagelar
<b>LBCM</b>	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
<b>MMS</b>	Metanossulfonato de metila
<b>MPP</b>	peptideo penetrador de mitocôndria
<b>mt-cbl</b>	Clorambucil-alvo-mitocôndria
<b>NADPH</b>	Fosfato De Dinucleótido De Nicotinamida E Adenina
<b>NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeos
<b>NHEJ</b>	Reparo de junções não homólogas
<b>PBS</b>	tampão fosfato-salino
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>rCSB</b>	<i>Conserved Sequence Blocks</i>
<b>RECC</b>	Complexo catalítico de edição de RNA
<b>RESC</b>	Complexo de ligação ao substrato de edição de RNA
<b>RPA</b>	Proteína de replicação A
<b>SOD</b>	Família superóxido dismutases (SOD)
<b>SSB</b>	Quebra de fita simples
<b>ssDNA</b>	Longos trechos de DNA de fita simples
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TAC</b>	Ligação tripartida

<b>TC-NER</b>	Reparo por excisão de nucleotídeo – Acoplado a transcrição
<b>TFIIH</b>	Complexo II H.
<b>TLS</b>	Síntese translesão
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>
<b>XP</b>	Xeroderma pigmentoso

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	Doença de Chagas .....	16
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> e o seu ciclo de vida .....	18
1.3	Cinetoplastídeos.....	22
1.3.1	Proteínas associadas ao cinetoplasto .....	23
1.3.2	Características estruturais do kDNA .....	24
1.3.3	Replicação do kDNA .....	25
1.3.4	Informação gênica do kDNA .....	29
1.3.4.1	Edição dos mRNA .....	31
1.4	Estresse oxidativo no <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
1.5	Resposta ao dano do DNA .....	35
1.5.1	Reparo de DNA .....	37
1.5.1.2	Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) .....	39
1.5.1.3	Reparo por recombinação homóloga.....	43
1.5.2	Reparo de DNA mitocondrial .....	46
1.6	Fontes exógenas de dano ao DNA .....	52
1.6.1	Radiação ultravioleta C (UV-C) .....	53
1.6.2	Cisplatina .....	54
1.6.3	Doxorrubicina .....	57
1.7	Justificativa .....	60
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
2.1	Objetivo geral.....	61
2.2	Objetivos específicos .....	61
<b>3</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
3.1	Cultivo dos parasitos .....	62
3.2	Curvas de sobrevivência na presença de agentes genotóxicos .....	62
3.2.1	Tratamento com Radiação UV-C .....	62
3.2.2	Tratamento com cisplatina .....	63
3.2.3	Tratamento com doxorrubicina .....	63
3.2.4	Tratamento com Doxorrubicina-alvo-mitocondria (Mt-Dox).....	63
3.3	Análise do número de lesões por <i>long range</i> qPCR .....	64
4.3.1	Tratamento genotóxico para análise do número de lesões .....	64
4.3.2	Extração de DNA .....	64
4.3.3	Dosagem das amostras de DNA .....	64
4.3.4	Amplificação por qPCR.....	65
4.3.5	Análise dos resultados.....	66
3.4	PCR em tempo real.....	67
3.5	Microscopia de Fluorescência.....	68

3.6	Pré-tratamento com inibidores das cinases ATM e ATR.....	68
3.7	Análise estatísticas .....	69
4	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
4.1	Ensaio de localização da Dox e mt-Dox.....	70
4.2	Resultados reparo por recombinação homóloga.....	72
4.2.1	Resultados TcRad51 <sup>+/-</sup> com Dox e mt-Dox.....	72
4.2.2	Resultados TcRad51 <sup>+/-</sup> tratada com cisplatina .....	74
4.2.3	Cinética de reparo de DNA lesionado com cisplatinas células TcRad51 <sup>+/-</sup> .....	74
4.2.4	Resposta TcTopo3 $\alpha^{\text{ko}}$ e Topo3 $\beta^{\text{Ko}}$ a Dox e mt-Dox .....	77
4.3	Resultados reparo acoplado ao processo de transcrição .....	<b>80</b>
4.3.1	Resposta das células TcCSB <sup>+/-</sup> e TcCSB <sup>+</sup> a Dox e mt-Dox.....	80
4.3.2	Sinalização por mt-Dox .....	84
4.3.3	Resposta do <i>T. cruzi</i> a Radiação UV.....	85
4.3.4	Análise do número de lesões por <i>long range</i> qPCR com UV-C .....	87
4.3.6	Análise do número de lesões por <i>long range</i> qPCR com cisplatina .....	91
4.3.7	Análise do número de transcritos por <i>real time</i> .....	93
4.3.8	Resultados com células nocaute de TcKap7.....	97
4.3.9	Resposta das células TcKap7 <sup>KO</sup> a Dox e mt-Dox.....	97
4.3.10	Análise do número de transcritos por Real time .....	99
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>103</b>
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>125</b>
7	<b>REFRÊNCIAS</b> .....	<b>126</b>
8	<b>APÊNDICE A – Artigo submetido</b> .....	<b>155</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença zoonótica, sendo endêmica em 21 países da América Latina. Seu agente etiológico é o parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), transmitido principalmente por vetores hematófagos da subfamília Triatominae, conhecidos comumente como barbeiros (LOPEZ-GARCIA; GILABERT, 2023). Na América Latina, estima-se que aproximadamente 6 milhões de indivíduos estejam infectados pelo *T. cruzi* e outros 70 milhões estejam sob risco de infecção, com uma média de 30 mil novos casos, cerca de 12 mil mortes e aproximadamente 9 mil recém-nascidos infectados durante a gestação registrados anualmente (LOPEZ-GARCIA; GILABERT, 2023; PAHO, 2024). No Brasil, estima-se que 2 a 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita (BRASIL, 2024).

O *T. cruzi* foi identificado como o agente causador da doença de Chagas em 1909 pelo médico brasileiro Carlos J. Chagas e, até hoje, continua sendo um grande problema de saúde pública na América Latina, sendo classificada como uma das 19 doenças tropicais negligenciadas, desde 2005, de acordo com a OMS (WHO, 2024). A infecção ocorre quando fezes do triatomíneo contendo o parasito são inoculadas através de um local onde houve o rompimento da barreira do epitélio, comumente relacionado ao próprio local da picada do vetor, ou até mesmo pelo contato das fezes com uma membrana mucosa intacta, como os olhos e a boca (PEREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). A transmissão vetorial é limitada a áreas geográficas que incluem regiões da América do Sul, América Central e o sul da América do Norte. No entanto, outras formas de infecção, como transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita, ingestão de alimentos e bebidas contaminadas, e até acidentes de laboratório que envolvem a manipulação do parasita, ajudam a propagar a doença em regiões endêmicas e não endêmicas (Figura 1) (BERN, 2011; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; WHO, 2024).



Atualmente, não existem vacinas para o tratamento ou prevenção da doença de Chagas e o tratamento se limita ao uso dos fármacos benzonidazol (BZ) e nifurtimox. A utilização desses fármacos é dispendiosa e envolve muitas complicações, como efeitos colaterais severos e baixo índice de proporção de cura, situando-se entre apenas 5% a 20% para as pessoas tratadas, principalmente na fase aguda da doença (BELLERA; BALCAZAR; ALBERCA; LABRIOLA *et al.*, 2013; BRASIL, 2024; CANÇADO, 2002). Devido a essas complicações, vários estudos buscam possíveis moléculas ativas, baseadas em alvos como proteínas essenciais à sobrevivência do parasito, assim como proteínas específicas da mitocôndria. Dentre as principais metodologias de estudo desses alvos está a utilização de ferramentas de bioinformática na busca de inibidores específicos. Promissores candidatos a alvos terapêuticos são as enzimas relacionadas ao metabolismo de DNA, que se tornam mais interessantes se apresentarem peculiaridades únicas no parasito, sendo essenciais para a manutenção do seu ciclo de vida. Além de propiciar potenciais alvos terapêuticos, o estudo do metabolismo de DNA permite compreender aspectos importantes da biologia básica do *T. cruzi*. (LISVANE SILVA; MANTILLA; BARISON; WRENGER; SILBER, 2011; REPOLÊS, 2019; ZUMA; CAVALCANTI; MAIA; DE SOUZA; MOTTA, 2011).

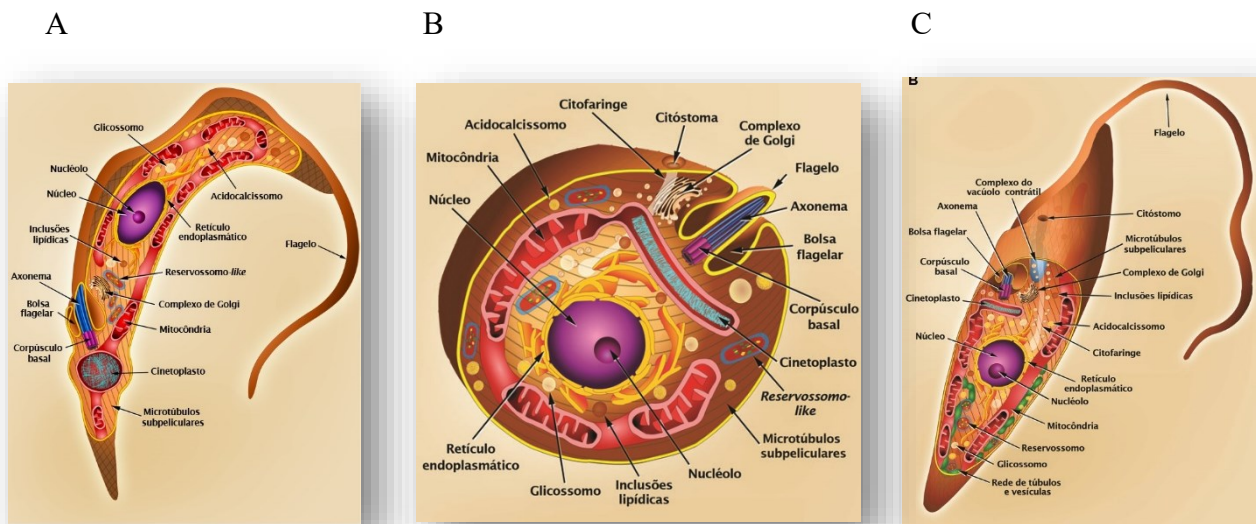
## 1.2 *Trypanosoma cruzi* e o seu ciclo de vida

O *T. cruzi* é um protozoário da família Trypanosomatidae, pertencente à classe Kinetoplastea, assim como a *Leishmania sp.* e o *Trypanosoma brucei*. Esses organismos possuem uma estrutura única entre os eucariotos, que é a presença de uma única mitocôndria contendo uma estrutura chamada cinetoplasto, onde está armazenado o genoma mitocondrial (kDNA). Uma característica morfológica específica desses organismos é a capacidade de alterar sua forma celular durante o ciclo de vida. Essas mudanças podem incluir estágios de desenvolvimento replicativos e estágios infecciosos (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; MASLOV; OPPERDOES; KOSTYGOV; HASHIMI *et al.*, 2019).

Entre os tripanossomatídeos, o *T. cruzi* apresenta um dos ciclos de vida mais complexos. O parasito assume vários estágios de desenvolvimento e três formas celulares, sendo encontradas em insetos vetores e hospedeiros mamíferos. No ser humano, que é um dos hospedeiros, assim como todos os mamíferos que o parasito infecta, ele assume duas formas celulares distintas (tripomastigota e amastigota). A forma tripomastigota (Figura 2A) é uma forma infectiva e não replicativa, apresentando em sua morfologia um flagelo que se estende

ao longo da borda externa de uma membrana ondulante. Essa forma é responsável por gerar a infecção por todo o corpo do hospedeiro e retroalimentar o ciclo. A forma amastigota (Figura 2B), que não possui flagelo, tem um formato oval e se multiplica dentro de vários tipos celulares nucleados, preferindo as células de origem mesenquimal. A forma epimastigota (Figura 2C) apresenta em sua estrutura um flagelo emergindo do corpo basal e um disco de DNA do cinetoplasto (kDNA) próximo ao núcleo, ela é a forma replicativa que se encontra no intestino do triatomíneo (ENGMAN, 2001; MARTINS-MELO; ALENCAR; RAMOS; HEUKELBACH, 2012; SOUZA, 1999).

Figura 2 — Representação estrutural das 3 formas de vida do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Representação estrutural das 3 formas de vida do *Trypanosoma cruzi*

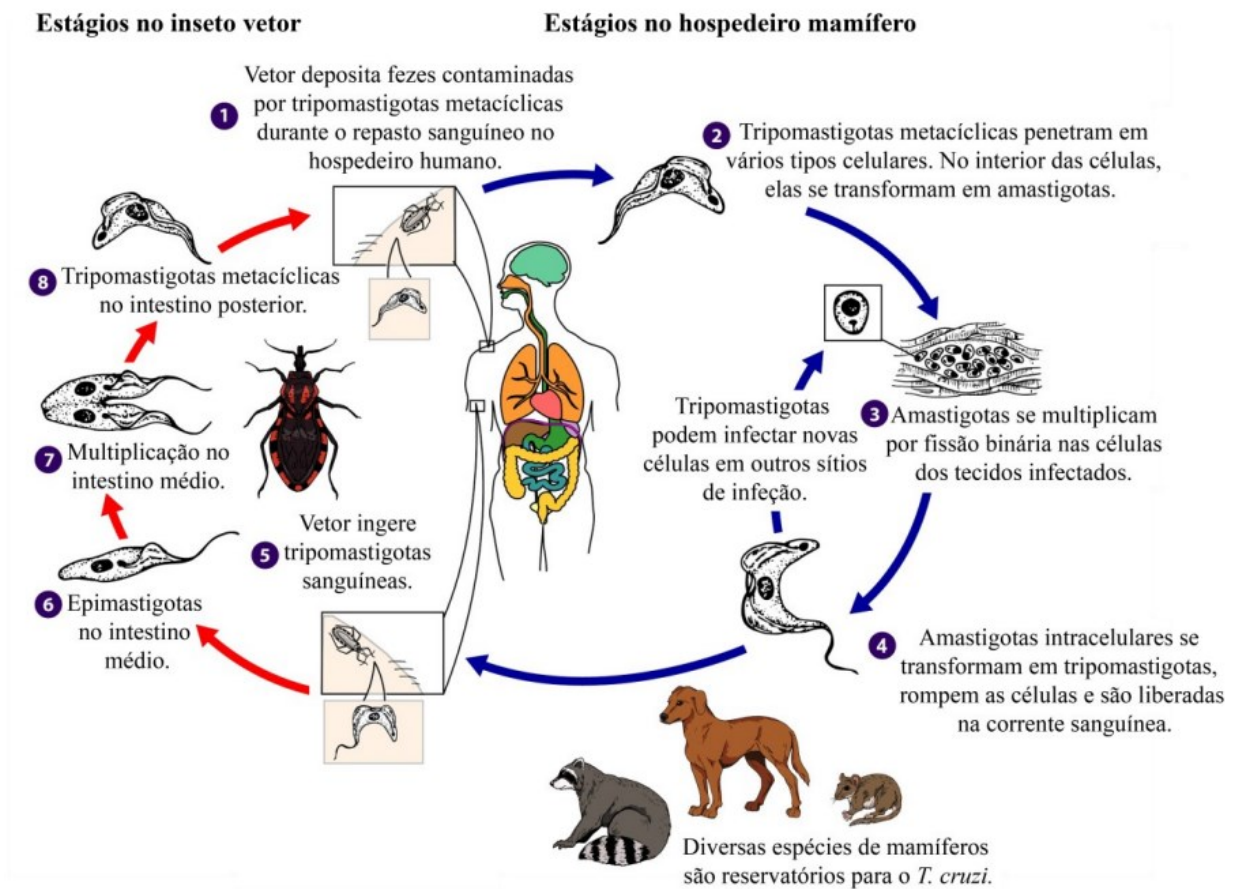
A) Tripomastigota forma alongada, com cinetoplasto com formato arredondado localizado na região posterior ao núcleo, flagelo emergindo da bolsa flagelar que se localiza lateralmente, na região posterior do parasito. O flagelo emerge e se adere ao longo do corpo do parasito, tornando-se livre na região anterior;

B) Amastigota forma arredondada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo, flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) que emerge da bolsa flagelar;

C) Epimastigota forma alongada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão localizado anteriormente ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar com abertura lateral, e percorre aderido à parte do corpo do parasita, tornando-se livre na região anterior.

Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.*, 2012.

O ciclo do *T. cruzi* se inicia quando o hospedeiro invertebrado (um triatomíneo da família Reduviidae) (Figura 3), realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, contaminando-se com tripomastigotas circulantes. Essas tripomastigotas não replicativas se diferenciam em sua forma replicativa epimastigota e se alojam no intestino médio do vetor. Posteriormente, as epimastigotas migram para a ampola retal do triatomíneo e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas infectantes. Essas, então, são liberadas juntamente com as fezes do vetor e podem, por meio de uma ferida comumente decorrente da picada, entrar na corrente sanguínea e invadir as células do hospedeiro mamífero. No citoplasma dessas células, as tripomastigotas se diferenciam na forma amastigota intracelular e iniciam o processo de replicação durante um período de 4 a 5 dias. No final desse período, as amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, levando as células infectadas a se romperem, promovendo sua liberação para a corrente sanguínea novamente. Nesse ponto, esses parasitos circulantes estão suscetíveis a contaminar outros vetores ou reinfestar outras células, a fim de manter a infecção (BERN, 2011; BERN, 2015; ENGMAN, 2001; MARTINS-MELO; ALENCAR; RAMOS; HEUKELBACH, 2012).

Figura 3 — Ciclo de vida do *T. cruzi*

Legenda: O ciclo de vida do parasito inclui insetos vetores, hospedeiros mamíferos e diferentes morfologias

- (1) O ciclo se inicia quando o inseto vetor triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro, realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero e deposita fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicas (formas não replicativas) próximo ao local da picada
- (2) As tripomastigotas metacíclicas em seguida entram no novo hospedeiro através do local da picada, lesões preexistentes na pele ou mucosas íntegras como a conjuntiva
- (3) Após invadirem células nucleadas, as tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas intracelulares, que realizam vários ciclos replicativos por fissão binária
- (4) As amastigotas então se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas (formas não replicativas) que são liberadas pelo rompimento da célula hospedeira. Nesse momento, novos ciclos de infecção podem ocorrer em células adjacentes ou as tripomastigotas podem ganhar a corrente sanguínea e infectar células localizadas em outros tecidos
- (5) Os parasitos circulantes podem ser ingeridos por insetos vetores durante um novo repasto sanguíneo em humanos ou em outras espécies de mamíferos. Várias dessas espécies também funcionam como reservatórios para o *T. cruzi*
- (6) No intestino médio do inseto vetor, as tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas
- (7) Essas formas também se replicam nessa porção do trato digestivo
- (8) No intestino posterior do inseto, ocorre a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas que são as formas infectivas responsáveis pelo reinício do ciclo de transmissão do *T. cruzi* (BERN, 2015; CDC, 2021; WHO, 2023).

Fonte: Adaptado de CDC, 2021.

### 1.3 Cinetoplastídeos

O *T. cruzi* é um organismo da classe dos cinetoplastídeos, como mencionado anteriormente, sendo um grupo de protozoários flagelados que apresentam uma única mitocôndria. No interior dessa mitocôndria há uma complexa estrutura de DNA mitocondrial conhecida como DNA cinetoplastídeo (kDNA). Essa classe possui uma biologia celular muito semelhante, com todos os protozoários sendo móveis e possuindo um único flagelo que se origina próximo a sua grande e única mitocôndria (GIBSON, 2016; STUART; BRUN; CROFT; FAIRLAMB *et al.*, 2008; TELLERIA; BIRON; BRIZARD; DEMETTRE *et al.*, 2010). Além disso, os peroxissomos desses organismos passaram por modificações para realizar o metabolismo da glicose, sendo denominados glicossomos (TAYLOR; GUTTERIDG, 1987). Sua membrana celular é sustentada por uma camada de microtúbulos e contém diversas proteínas na superfície. O DNA mitocondrial desses protozoários é composto por duas unidades chamadas maxicírculos e minicírculos, interligadas e compactadas em forma de disco. No entanto, em alguns membros da classe, o DNA pode estar disperso na mitocôndria (GIBSON, 2016).

Esses organismos geralmente se reproduzem assexuadamente, embora a reprodução sexual tenha sido demonstrada em *T. brucei* (PEACOCK; BAILEY; GIBSON, 2016). Nosso grupo também obteve evidências desse processo em *T. cruzi* (ALVES; REPOLES; DA SILVA; MENDES *et al.*, 2018). Cada cinetoplastídeo possui aproximadamente 12.000 genes, com mais de 6.000 ortólogos em comum. Eles se adaptam a diferentes ambientes com amplo controle da expressão gênica, organizando os genes codificadores de proteínas não relacionados em funções em clusters gênicos na mesma fita de DNA. Esse processo de transcrição resulta na geração de longos pré-RNAs policistrônicos, que são praticamente desprovidos de íntrons (CLAYTON, 2019; DE PABLOS; OSUNA, 2012; EL-SAYED; MYLER; BARTHOLOMEU; NILSSON; AGGARWAL; TRAN; GHEDIN; WORTHEY; DELCHER; BLANDIN; WESTENBERGER; CALER; CERQUEIRA; BRANCHE; HAAS; ANUPAMA; ARNER; SLUND *et al.*, 2005; MARTINEZ-CALVILLO; VIZUET-DE-RUEDA; FLORENCIO-MARTINEZ; MANNING-CELA; FIGUEROA-ANGULO, 2010).

### 1.3.1 Proteínas associadas ao cinetoplasto

O metabolismo único do cinetoplasto envolve uma classe específica de proteínas exclusiva dos Kinetoplastida, conhecidas como proteínas associadas ao cinetoplasto (proteínas KAP, do inglês *kinetoplasts-associated protein*). Essas proteínas são caracterizadas pelo seu pequeno tamanho, variando entre 15kDa a 27kDa, e são proteínas básicas devido à alta concentração de arginina e lisina em sua estrutura (MORINI, 2015). A identificação inicial dessa classe de proteínas ocorreu no cinetoplasto do tripanossomatídeo *Crithidia fasciculata*, em que foram descritas cinco delas, denominadas CfKAP1 a CfKAP5 (XU; HINES; ENGEL; RUSSELL; RAY, 1996). Entretanto, ainda há escassez de informações sobre suas funções, embora algumas pareçam estar associadas ao metabolismo do kDNA.

Estudos indicam que a ausência de CfKAP1 resulta na desorganização da rede do kDNA (LUKEŠ; HINES; EVANS; AVLIYAKULOV *et al.*, 2001), enquanto os nocautes de CfKAP2 e CfKAP3 ocasionam problemas na replicação do organismo, redução na taxa de consumo de oxigênio e desregulação na expressão de genes do maxicírculos do parasito (AVLIYAKULOV; LUKEŠ; RAY, 2004). Em *T. brucei*, a diminuição da expressão da proteína TbKAP6 por RNAi levou à perda do kDNA, acompanhada de uma desorganização e aparente encolhimento do disco de kDNA, resultando em complicações na replicação do conteúdo gênico dessa organela (WANG; PAPPAS-BROWN; ENGLUND; JENSEN, 2014).

No genoma do *T. cruzi*, embora seis proteínas KAPs tenham sido descritas, há poucos estudos sobre suas funções. Até o momento, foi observado que TcKAP4 e TcKAP6 se localizam no disco de kDNA desse parasita, com a localização dependendo da fase do ciclo celular (CAVALCANTI; SHIMADA; PROBST; SOUTO-PADRÓN *et al.*, 2009). TcKAP3, outra KAP descrita em *T. cruzi* não revelou fenótipo após sua depleção, nem alterou sua taxa de infectividade e ao contrário das outras KAPs descritas anteriormente, não influenciou a estrutura do kDNA (DE SOUZA; RAMPAZZO; MANHAES; SOARES *et al.*, 2010). Esses resultados levaram à hipótese de que essas proteínas podem desempenhar diversas funções na mitocôndria, ainda pouco compreendidas. Trabalhos anteriores do nosso grupo com TcKAP7 indicam o envolvimento dessa proteína nos processos do metabolismo do kDNA após danos causados por UV (REPOLÊS, 2019), e há evidências de seu papel no controle do processo de transcrição mitocondrial.

### 1.3.2 Características estruturais do kDNA

O cinetoplasto do *T. cruzi* apresenta uma estrutura de disco (poli-kDNA) correspondente a 15% do DNA total do parasita. Essa estrutura forma uma rede gigante semelhante a um grande corpo nucleóide, composta por uma única rede de DNA, com anéis de DNA interligados. Essa configuração é completamente incomum, uma vez que consiste em dois genomas separados, cujos produtos de RNA interagem para produzir mRNAs funcionais para o processo de tradução (SIMPSON, 1987; SIMPSON; THIEMANN; SAVILL; ALFONZO; MASLOV, 2000; SIMPSON; BRUNO; CHEN; LOTT *et al.*, 2017). Esses genomas são denominados maxicírculos e minicírculos, concatenados entre si em uma estrutura semelhante a uma corrente (BAPTISTA; VENCIO; ABDALA; CARRANZA *et al.*, 2006; TELLERIA; BIRON; BRIZARD; DEMETTRE *et al.*, 2010). O kDNA apresenta uma estrutura peculiar, com tamanho e formato variável durante os diferentes estágios de desenvolvimento do protozoário. Nos tripomastigosta, ele adquire uma forma de cesta, enquanto em epimastigotas e amastigotas, o kDNA apresenta um aspecto de bastonete (TELLERIA; BIRON; BRIZARD; DEMETTRE *et al.*, 2010).

Os maxicírculos estão presentes em aproximadamente 20 a 50 cópias por rede, o que é equivalente ao DNA mitocondrial clássico de mitocôndrias, contendo 20 genes. Diferentemente de outras mitocôndrias, não apresentam os genes dos RNAs transportadores mitocondriais, estes que são importados e editados dos tRNA nucleares (APHASIZHEV; APHASIZHEVA, 2011; SALINAS-GIEGÉ; GIEGÉ; GIEGÉ, 2015). Aparentemente, são cópias idênticas que variam entre 20 a 38 kB (GUILBRIDE; ENGLUND, 1998). Enquanto os minicírculos estão presentes em aproximadamente 20 a 30 mil unidades, com um tamanho aproximado de 14 kb, mas com sequências heterogênicas, cada minicírculo contém quatro regiões de aproximadamente 100 pb que apresentam sequências praticamente idênticas para todas as linhagens de *T. cruzi*. Esses domínios constantes são localizados às 3, 6, 9 e 12 horas do minicírculo, chamados de rCSB (do inglês *conserved sequence blocks*) (RAY, 1989). As sequências de nucleotídeos que separam esses domínios constantes contêm em média de 280 a 320 pb e são chamadas mHVR (do inglês *minicircle hypervariable regions*) e é onde se encontram todos os genes de gRNA que são produzidos pelos minicírculos (DEGRAVE; FRAGOSO; BRITTO; VAN HEUVERSWYN *et al.*, 1988; JENSEN; ENGLUND, 2012; LIU; LIU; MOTYKA; AGBO; ENGLUND, 2005).

Estudos sobre o metabolismo do kDNA foram essenciais para descrever processos importantes no metabolismo de diversos organismos. Como a descoberta da edição de RNA em eucariotos em *Trypanosoma brucei*, assim como em *T. cruzi*, estudos sobre o complexo 1 da cadeia respiratória desde organismo foi crucial para a compreensão de uma variedade existente em humanos. Assim como a descrição de canais transportadores de cálcio mitocondriais levou à descoberta de homólogos em outros organismos (VERNER; BASU; BENZ; DIXIT *et al.*, 2015).

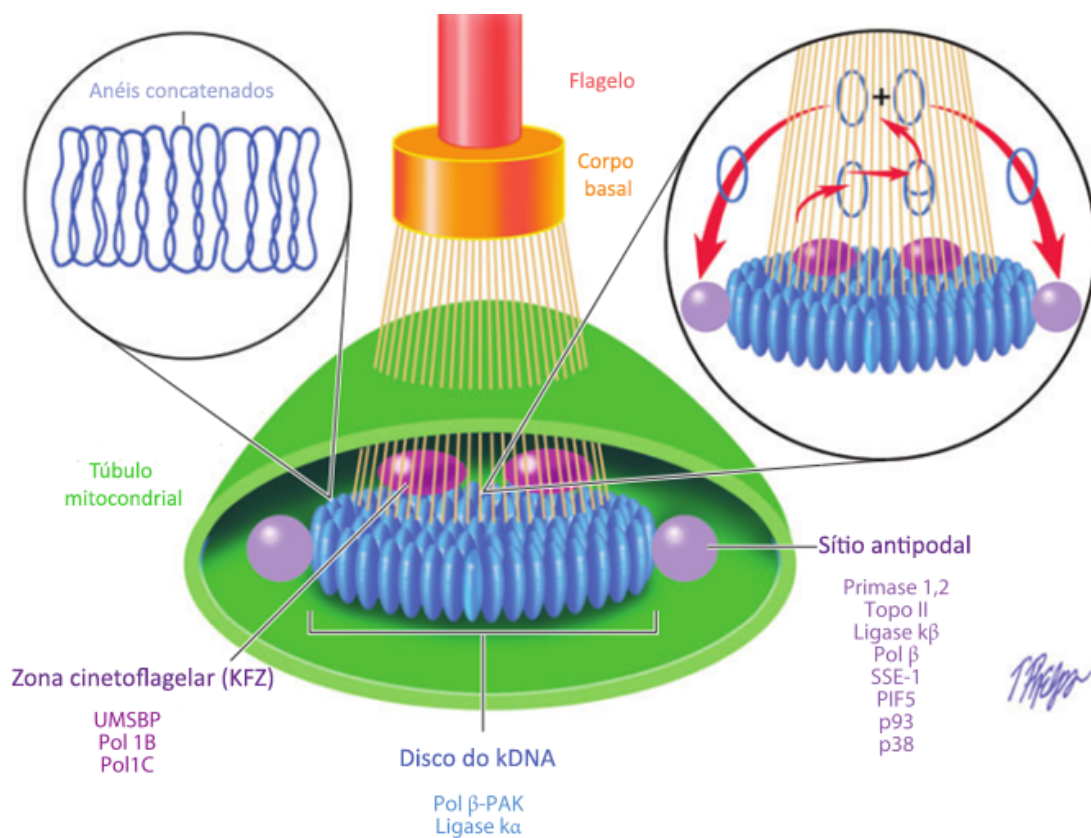
### 1.3.3 Replicação do kDNA

Nos cinetoplastídeos, todas as cópias do genoma mitocondrial estão fisicamente ligadas entre si na matriz mitocondrial, na região do cinetoplasto, ou seja, todos os minicírculos e maxicírculos estão topologicamente interligados em uma rede gigante, coletivamente chamada de kDNA (Figura 4). Como a perda de uma única classe de minicírculo poderia impedir a edição adequada de uma transcrição crucial do maxicírculo, existe um mecanismo sofisticado para garantir a fidelidade da duplicação do kDNA. O processo de replicação é descrito como ocorrendo em três etapas distintas: replicação do kDNA, divisão da rede replicada e segregação para células filhas (JENSEN; ENGLUND, 2012; POVELONES, 2014).

É proposto na literatura dois mecanismos principais: o mecanismo em anel, utilizado teoricamente por *T. cruzi* e *Leishmania major*. Nesse mecanismo, o disco de kDNA gira em relação aos sítios antipodais, fazendo o sistema se movimentar em forma circular, com os sítios antipodais fixos, fragilizando o disco de kDNA. Contudo, o mecanismo e as proteínas envolvidas ainda não foram elucidados, e esse fenômeno só foi demonstrado até o momento de forma indireta (GUILBRIDE; ENGLUND, 1998; JENSEN; ENGLUND, 2012; LIU; LIU; MOTYKA; AGBO; ENGLUND, 2005). O segundo mecanismo é o mecanismo polar (Figura 4), utilizado por *T. brucei*, que ao contrário do mecanismo em anel é mais compreendido. Nesse mecanismo, tanto os minicírculos quanto os maxicírculos se replicam unidirecionalmente, formando um intermediário teta. Os maxicírculos permanecem ligados à rede, enquanto os minicírculos devem ser liberados da rede para serem replicados. O processo de replicação dos minicírculos é compreendido com mais detalhes. Os minicírculos individuais são liberados da região central da rede por uma atividade de topoisomerase do tipo II. Após a liberação, os minicírculos são encontrados na zona cinetoflagelar (KFZ), que é a região da matriz entre o cinetoplasto e as membranas mitocondriais mais próximas da região do corpo basal do flagelo. Nessa região, inicia-se a replicação. Os minicírculos são transportados por um mecanismo

desconhecido para dois conjuntos de proteínas que flanqueiam o disco do kDNA, chamados sítios antipodais. As enzimas nesses locais catalisam a remoção do primer e o reparo da maioria dos *gaps*. Contudo, é deixado propositalmente pelo menos um corte ou lacuna, que é utilizado como um marcador dos minicírculos que já foram replicados daqueles que ainda não foram, para assim, realocar corretamente esses minicírculos na sua respectiva rede nascente (ENGLUND, 1979; GUILBRIDE; ENGLUND, 1998; POVELONES, 2014; SHAPIRO; SHOWALTER, 1994).

Figura 4 — Modelo de replicação do kDNA.



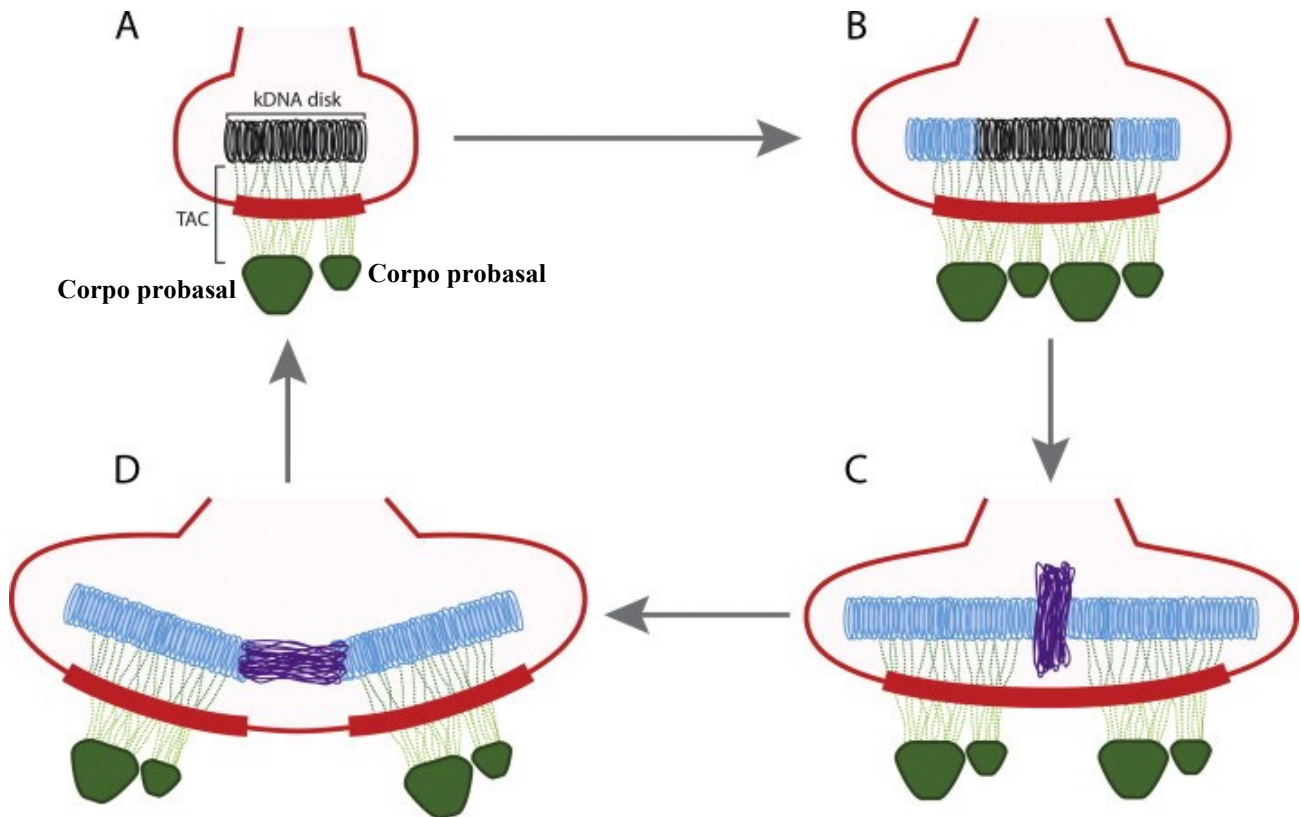
**Legenda:** Apresenta-se o túbulo mitocondrial (verde), adjacente ao corpo basal do flagelar, o disco de kDNA, que é organizado com minicírculos empilhados em paralelo ao seu eixo. Locais de proteínas de replicação críticas também são mostrados. Uma seção ampliada do disco do cinetoplasto mostra que eles estão esticados, ficam lado a lado e são concatenados para minicírculos e maxicírculos (não mostrados). Para replicação, os minicírculos são liberados da rede para o KFZ, onde iniciam a replicação como estruturas teta. Acredita-se que os minicírculos irmãos migram para os locais antípodos, onde a remoção do primer por SSE-1 e PIF5, preenchimento de lacunas por Pol  $\beta$  e selamento da maioria dos cortes por DNA ocorre com a ligase  $\kappa\beta$ . Os minicírculos são então anexados à periferia da rede pela topo II. No final da replicação, minicírculos contendo pelo menos uma lacuna são reparados na rede por Pol  $\beta$ -PAK, DNA ligase  $\kappa\alpha$  e outras proteínas. O complexo de ligação tripartida (TAC) que liga o kDNA ao corpo basal do flagelar também é mostrado (em laranja).

Fonte: Adaptado de Jensen, 2012.

Após o processo de replicação, a partição e segregação dos dois cinetoplastos são realizadas por uma estrutura chamada de complexo de ligação tripartida (TAC) (Figura 5). Essa estrutura é responsável por ligar fisicamente a rede de kDNA ao corpo basal do flagelo (OGBADOYI; ROBINSON; GULL, 2003). O corpo basal se duplica ao mesmo tempo que o kDNA e os dois kDNAs filhos se separam durante a segregação do corpo basal (Figura 5B). Cada kDNA é ligado ao seu respectivo corpo basal pelo seu próprio TAC. Diferentemente dos minicírculos, que são remontados em sua própria rede nascente, os maxicírculos nascentes permanecem topologicamente interligados entre si, assim como com a rede de minicírculo correspondente. Esses maxicírculos tornam-se então esticados em uma estrutura de “fio”, ou *nabelschnur*, conectando as duas redes segregantes, que continuam ligadas no início do processo da divisão, apenas quando os discos de kDNAs estão separados por 1 µm de distância um do outro, estes são clivados e separados (Figura 5D), possibilitando então a finalização da divisão (GLUENZ; POVELONES; ENGLUND; GULL, 2011; GLUENZ; SHAW; GULL, 2007). Embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos, é provável que essa divisão do maxicírculo envolva a enzima topoisomerase II. Acredita-se que esse processo opere tanto em *T. brucei*, *T. cruzi* e *C. fasciulata* (GUILBRIDE; ENGLUND, 1998; PÉREZ-MORGA; ENGLUND, 1993; POVELONES, 2014).

Após a divisão, todos os cortes e lacunas restantes nos minicírculos são reparados, tornando-os prontos para uma nova rodada de replicação. Os corpos basais continuam a se segregar, agindo como uma espécie de centrossomo para organizar a divisão da célula, sempre permanecendo ligados no kDNA pelo TAC (LACOMBLE; VAUGHAN; GADELHA; MORPHEW *et al.*, 2010; POVELONES, 2014).

Figura 5 — Modelo de replicação e divisão do kDNA



## Legenda:

(A) Um kDNA de fase G1 não replicado é rodeado intimamente pela membrana dupla mitocondrial (mostrada como uma linha única em vermelho). O disco kDNA está ligado aos corpos basal e probasal pelo TAC.

(B) Um cinetoplasto na fase S. Minicírculos não replicados (pretos) são liberados da rede, replicados e recolocados nos pólos. Os Minicírculos replicados são mostrados em azul. O disco cresce lateralmente à medida que a replicação prossegue. O corpo probasal deu origem a um novo corpo basal, e um novo corpo probasal também se desenvolveu. Sendo assim O TAC também se duplicou.

(C) a replicação do kDNA está completa. As duas redes de minicírculos (azul) foram separadas uma da outra, mas ainda estão conectadas pela rede de maxicírculo replicada (roxo).

(D) começa a segregação de kDNA. À medida que os corpos basais começam a se separar, o complexo TAC permite a separação dos kDNAs filhos. A rede de maxicírculo (roxo) torna-se esticada em um "fio" ou estrutura nabelschnur, que é posteriormente resolvida. Para simplificar os maxicírculos são mostrados apenas em (C) e (D).

Fonte: Adaptado de Povelones, 2014.

### 1.3.4 Informação gênica do kDNA

Os maxicírculos são homólogos do DNA mitocondrial clássico de outros eucariotos, como já descrito, contendo 20 genes. Assim como as mitocôndrias de outros organismos, são transcritos de forma policistrônica (FEAGIN; JASMER; STUART, 1985; READ; MYLER; STUART, 1992). Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a expressão gênica de maxicírculos ou minicírculos. Os genes codificadores de rRNA e proteínas estão localizados em ambas as cadeias da região conservada de 17 kB de comprimento do maxicírculo (Figura 6) (SLOOF; DE HAAN; EIER; VAN IERSEL *et al.*, 1992). A transcrição da cadeia principal é iniciada aproximadamente ~1200 nt a montante do gene 12s RNA, enquanto as origens da transcrição da cadeia menor ainda não foram determinadas (MICHELOTTI; HARRIS; ADLER; TORRI; HAJDUK, 1992).

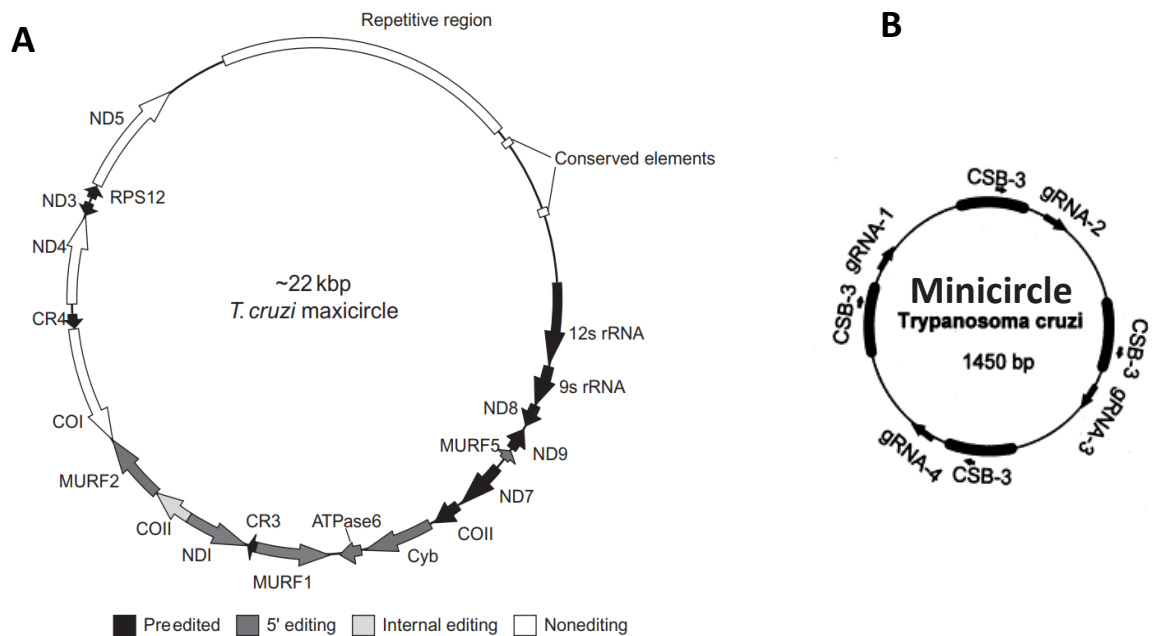
Visualizando inicialmente o genoma do maxicírculo (Figura 6.A), ele parece estar incompleto, não apresentando elementos-chave para a tradução correta de alguns genes, como a ausência de alguns códons de iniciação e algumas ORFs (quadro de leitura aberto) com quadros de leitura errados (FERNANDEZ-MOYA; ESTEVEZ, 2010). Considerando que a informação contida numa sequência genômica é classicamente reproduzida com precisão no RNA, no caso do *T. cruzi* isso não levaria a produção de proteínas funcionais, então esse organismo, assim como outros tripanossomatídeos corrigem essas imperfeições por um sistema de edição de RNA codificado pelo minicírculo. Isso permite restaurar a capacidade de codificação da maioria dos genes por modificações pós-transcricionais que envolvem inserções e deleções de uridinas. Essas edições "corrigem" a ORF, além de criar códons de iniciação antes do processo de tradução, permitindo a produção de uma sequência funcional para codificação dessas proteínas (BENNE, 1989; FEAGIN; JASMER; STUART, 1985; LIU; WANG; LI; ZHANG *et al.*, 2023; STUART; BRUN; CROFT; FAIRLAMB *et al.*, 2008; TELLERIA; BIRON; BRIZARD; DEMETTRE *et al.*, 2010).

A edição foi descoberta em 1986 por Benne e colaboradores, onde observaram que quatro resíduos de uridinas não codificadas pelo gene foram inseridos pós-transcricionalmente em locais específicos no mRNA da citocromo oxidase II. Esse processo foi então denominado edição mediada por RNA (BENNE; VAN DEN BURG; BRAKENHOFF; SLOOF *et al.*, 1986). Posteriormente, outros trabalhos indicaram que mRNAs de 12 dos 20 genes codificados no maxicírculo de *T. brucei* exigiam esse processo para maturação de mRNAs funcionais para a codificação de proteínas. Essas inserções criam, então, como já descrito, quadros de leituras abertos pelas inserções ou deleções de centenas de resíduos de uridina (U) em transcritos do

maxicírculo (MASLOV; OPPERDOES; KOSTYGOV; HASHIMI *et al.*, 2019; SIMPSON; THIEMANN; SAVILL; ALFONZO; MASLOV, 2000; STUART; BRUN; CROFT; FAIRLAMB *et al.*, 2008). Desde a descoberta da edição do RNA mitocondrial dos tripanossomas, sabemos que este processo é o resultado de uma colaboração perfeita entre genes contidos tanto nos maxicírculos como nos minicírculos. Os maxicírculos fornecem RNA pré-editado, e os minicírculos contribuem com guias de RNA (gRNA). A existência destes gRNAs em *T. cruzi* e seu papel na edição do maxicírculo de RNA transcrito foram demonstrados por Ávila e Simpson (1995) e Thomas *et al.* (2007). Essa edição do RNA deve ser extremamente precisa para evitar erros (AVILA; SIMPSON, 1995; THOMAS; MARTINEZ; WESTENBERGER; STURM, 2007).

A comparação de sequências genéticas codificadas por maxicírculo de diferentes tripanossomas (*T. cruzi*, *T. brucei* e *Trypanosoma tarantolae*) revelou que os genes não editados entre esses organismos apresentam uma similaridade de mais de 75% (ND5, ND4, COI, COII, ND1, MURF1, MURF2, Cyb). Já em relação aos genes editados (COIII, ATPase6, ND7, ND8, ND9, CR4, CR5, RPS12), a similaridade é inferior a 50% no nível de DNA. No entanto, essa similaridade aumenta para 75% no nível proteico para a maioria das comparações, devido ao processo de edição de RNA. Isso sugere que, apesar da divergência nas sequências genéticas, há um resgate funcional por meio da edição transcricional (TELLERIA; BIRON; BRIZARD; DEMETTRE *et al.*, 2010).

O genoma do minicírculo é mais complexo, com uma estimativa de 200 a 400 classes de sequências de minicírculos, cada uma codificando 2 a 5 gRNAs (Figura 6.B). O número de RNAs guias, naturalmente excede em muito os requisitos para locais de edição conhecidos, embora gRNAs de sequências ligeiramente diferentes possam editar os mesmos locais (HONG; SIMPSON, 2003; OCHSENREITER; CIPRIANO; HAJDUK, 2007). Além dos gRNAs, os minicírculos codificam RNAs de tamanhos semelhantes, sem funções descritas até o momento (MADEJ; ALFONZO; HUTTENHOFER, 2007; MADEJ; NIEMANN; HUTTENHOFER; GORINGER, 2008). Dado o comprimento do minicírculo de ~1 Kb e a presença de mais de um gene de gRNA por minicírculo, os transcritos primários contendo gRNA também são provavelmente policistrônicos, assim como os maxicírculos, exigindo também um processamento nucleolítico (APHASIZHEV; APHASIZHEVA, 2011).

Figura 6 — Representação do maxicírculo e minicírculo do *T. cruzi*

Legenda: (A) Maxicírculo da cepa referência CL Brener, todos os genes anotados são mostrados, setas indicando a direção da codificação. As regiões não codificantes e sítios conservado entre cepas apresentados.

(B) Organização de gene gRNA no DNA de minicírculo de *T. cruzi* o tamanho aproximado de cada minicírculo é de 1450bp, é indicado a localização da região conservada (CSB).

Fonte: Adaptado de Westenberger, 2006; Telleria, 2010 e Simpson, 1997.

### 1.3.4.1 Edição dos mRNA

O processo de edição é complexo e preciso, sendo possível devido às sequências complementares dos guias de RNA que determinam o número exato de uridinas a serem adicionadas, retiradas ou convertidas (BLANC; DAVIDSON, 2003). Os genes no maxicírculo devem manter um certo grau de fidelidade aos genes gRNA para que a edição seja feita corretamente (BAPTISTA; VENCIO; ABDALA; CARRANZA *et al.*, 2006). No entanto, já é descrito que os gRNA, diferentemente dos mRNA do maxicírculo, apresentam um certo grau de tolerância sem perda da informação funcional, ou seja, podem sofrer mais mutações, isso explica a grande variabilidade de sequência dos gRNAs (WESTENBERGER; CERQUEIRA; EL-SAYED; ZINGALES *et al.*, 2006).

Os gRNAs têm um tamanho pequeno, variando de 50 a 70 nts de comprimento, e são divididos em três regiões que compõem sua estrutura primária: o domínio âncora, o domínio de informação e a cauda poli-U. A cauda de poli-U do gRNA é adicionada ao guia logo após a sua transcrição, e demonstrou interagir com sequências ricas em purinas a montante do sítio de edição (RUSMAN; FLORIDIA-YAPUR; TOMASINI; DIOSQUE, 2021). O domínio âncora é um pequeno trecho de 10 nts que se assemelha a uma sequência complementar no mRNA e é crucial para a ativação do processo de edição. O domínio de informação começa na incompatibilidade da primeira base, levando à formação de um duplex. Se o duplex imperfeito for no mRNA, será então um local de deleção; caso o duplex imperfeito seja no gRNA, será um local de inserção (Figura 7). As estruturas resultantes de intermediários de deleção e inserção são distintas: as uridinas de cadeia simples que ficam expostas no mRNA no primeiro caso tornam-se suscetíveis a um ataque exonucleolítico 3'-5', enquanto um espaço de cadeia simples é criado e, em seguida, são inseridas uridinas. Os fragmentos são então unidos para restaurar a continuidade do mRNA.

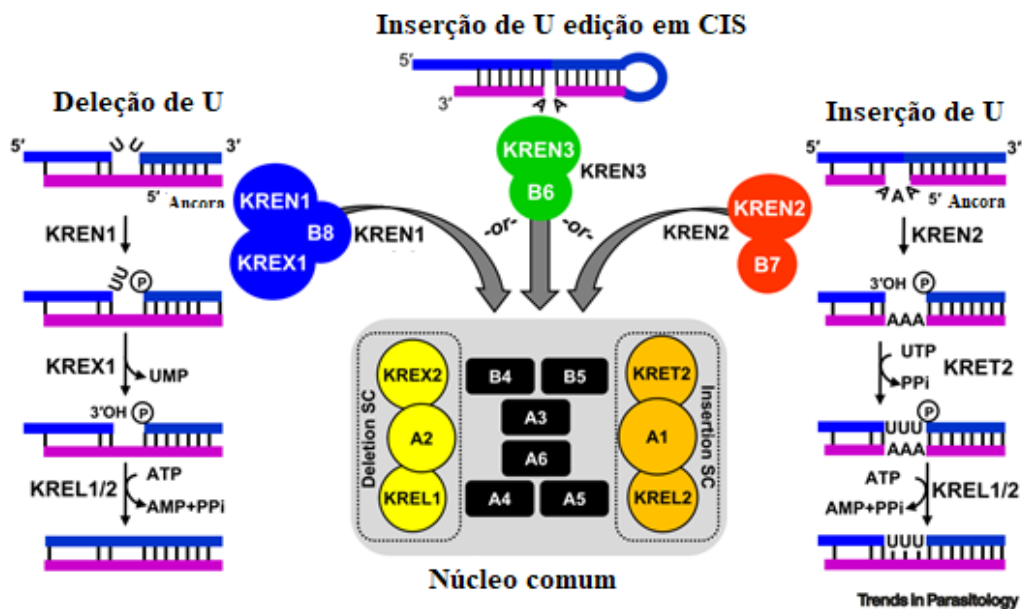
Ambas as modificações podem ampliar a região de âncora, o que pode favorecer edições abrangentes adicionais, exigindo múltiplos gRNAs sobrepostos. Ou seja, a alteração do primeiro gRNA cria um local de ligação para o próximo gRNA, garantindo uma continuidade global 3'-5' ao longo do domínio de edição. No entanto, pode haver erros, e quanto mais editado o mRNA, mais susceptíveis a erros eles são (APHASIZHEV; APHASIZHEVA; NELSON; GAO *et al.*, 2003; GERASIMOV; GASPARYAN; KAUROV; TICHY *et al.*, 2018; KOSLOWSKY; BHAT; READ; STUART, 1991; SIMPSON; BRUNO; BARD; BUCK; READ, 2016). Esse modelo de edição é denominado trans e quase todos os gRNAs atuam desta forma. Contudo, existe uma notável exceção, que é a edição de COX2, que utiliza um modelo de edição cis (Figura 7), ou seja, o gRNA não vem do minicírculo e sim está presente na 5' - UTR do próprio mRNA (GOLDEN; HAJDUK, 2005).

As reações de edição são catalisadas por enzimas incorporadas em um complexo catalítico de edição de RNA, complexo esse que possibilita uma ampla funcionalidade em substratos de RNA distintos (Figura 7) (APHASIZHEV; APHASIZHEVA; SIMPSON, 2003; GOLAS; BOHM; SANDER; EFFENBERGER *et al.*, 2009; LI; GE; HUI; ATANASOV *et al.*, 2009; PANIGRAHI; SCHNAUFER; ERNST; WANG *et al.*, 2003). Esse grupo de proteínas envolvidas foi então chamado de editossomo. O editossomo, parcialmente definido em *T. brucei*, inclui o complexo de ligação ao substrato de edição de RNA (RESC) e o complexo catalítico de edição de RNA (RECC). Acredita-se que componentes adicionais também estejam

envolvidos no funcionamento do editossoma (APHASIZHEV; APHASIZHEVA; NELSON; GAO *et al.*, 2003; APHASIZHEVA; ALFONZO; CARNES; CESTARI *et al.*, 2020; LIU; WANG; LI; ZHANG *et al.*, 2023). O complexo RESC é responsável por coordenar o processamento pré e pós-edição dos mRNAs, interagindo com o complexo de edição RECC, além de ser o único responsável pela estabilização do gRNA. (HASHIMI; CICOVA; NOVOTNA; WEN; LUKES, 2009; WENG; APHASIZHEVA; ETHERIDGE; HUANG *et al.*, 2008), assim como contribui para a edição e processabilidade do processo (SIMPSON; BRUNO; CHEN; LOTT *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo, esse complexo é responsável pela interação e ativação do complexo RECC (INNA, 2014; AMMERMAN, 2012; APHASIZHEVA, 2020).

O processo de edição é utilizado como controle da expressão gênica e contribui para a evolução dos estágios da vida celular e o metabolismo energético incomum do *T. cruzi* em seus estágios de vida, passando por tripomastigotas sanguíneos que estão em ambiente ricos em glicose, assim como para os epimastigotas que estão em um ambiente mais pobre em nutrientes no intestino do inseto vetor. (SHAW AUBIE; KALEM MURAT; ZIMMER SARA, 2016).

Figura 7 — Representação esquemática do complexo catalítico de edição de RNA (RECC)



- Legenda:
- (1) Edição por deleção de uridinas;
  - (2) Edição por inserção de uridinas em modelo trans;
  - (3) Edição por inserção em CIS, são justapostos com as endonucleases correspondentes de cada via. Doze proteínas centrais comuns, com vias catalíticas delimitada estão representadas.

Fonte: Adaptado de Aphasizheva, 2020.

#### 1.4 Estresse oxidativo no *Trypanosoma cruzi*

Durante o seu ciclo de vida, o *T. cruzi* é exposto a diferentes condições de estresse, principalmente ao estresse oxidativo. A sua fase de infecção no vetor é um momento extremamente estressante para o parasito, sendo uma fase exclusivamente extracelular, restrito ao lúmen do intestino e aos túbulos de Malpighi (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Nesse ambiente totalmente diferente, os tripomastigotas sanguíneos precisam sobreviver e se diferenciar da sua forma replicativa epimastigota (SCHAUB, 2021). A obtenção de nutrientes do epimastigota é oriunda da própria alimentação do inseto vetor; no entanto, ao digerir o sangue no intestino médio, uma grande quantidade de grupo heme é liberada. O grupo heme é uma molécula conhecida por aumentar a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e superóxido ( $O^{2-}$ ). Além disso, é relatado que leva à alteração da seletividade e permeabilidade das membranas (PAES, 2019; RYTER; OTTERBEIN; MORSE; CHOI, 2002; SCHMITT; FREZZATTI; SCHREIER, 1993). Portanto, a primeira região do intestino médio representa um ambiente rico em nutrientes, mas também é um ambiente potencialmente oxidativo que pode causar danos intensos aos componentes celulares, assim como lesões no DNA. Outro momento crítico ocorre durante a infecção nas células de mamíferos, onde respostas imunes são desencadeadas na fase aguda da infecção, com a produção de substâncias genotóxicas, como óxido nítrico (NO) e a formação de  $H_2O_2$  e  $O^{2-}$ . O NO é produzido principalmente pela isoforma induzida da enzima NO sintase, um mecanismo comum utilizado pelos macrófagos no combate a este e outros parasitos. Ao mesmo tempo, grandes quantidades de  $H_2O_2$  e  $O^{2-}$  são produzidas pela NADPH oxidase e expostas ao parasito com o objetivo de causar danos intensos aos componentes celulares, como proteínas, lipídios de membranas e lesões no DNA (MACALUSO; GRIPPI; DI BELLA; BLANDA *et al.*, 2023; NOEL; RAES; HASSANZADEH GHASSABEH; DE BAETSELIER; BESCHIN, 2004).

Para lidar com esse estresse oxidativo, este parasito dispõe de um sistema antioxidante dependente de tripanotiona (IRIGOÍN; CIBILS; COMINI; WILKINSON *et al.*, 2008). Um trabalho recente comparou o transcriptoma dos três principais estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. A análise de genes antioxidantes mostrou uma regulação positiva geral de muitos genes que participam das defesas antioxidantes em epimastigotas (trióxido tiorredoxina redutase, glutathione peroxidases e triparedoxina peroxidase) (BERNÁ; CHIRIBAO; GREIF; RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Com o sequenciamento do genoma, foi mostrado que *T. cruzi* (EL-SAYED; MYLER; BARTHOLOMEU; NILSSON; AGGARWAL; TRAN; GHEDIN; WORTHEY; DELCHER; BLANDIN; WESTENBERGER; CALER; CERQUEIRA;

BRANCHE; HAAS; ANUPAMA; ARNER; ÅSLUND *et al.*, 2005), *T. brucei* (BERRIMAN; GHEDIN; HERTZ-FOWLER; BLANDIN *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (IVENS; PEACOCK; WORTHEY; MURPHY *et al.*, 2005) não apresentam a enzima catalase. A expressão heteróloga da catalase de *Escherichia coli* em *T. cruzi* levou esse parasita a uma perda na capacidade de invasão e virulência, evidenciando, assim, que esse organismo utiliza de alguma forma o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como um mecanismo de sinalização importante para os seus processos biológicos básicos da infecção (FREIRE; ALVES; GOES; RESENDE *et al.*, 2017). Neste mesmo organismo foi demonstrado que a produção de espécies oxidantes induzida por heme potencializa a proliferação do protozoário ao ativar uma calmodulina cinase II-like (CaM kinase II) e modular sua bioenergética (NOGUEIRA; SOUZA; SARAIVA; SULTANO *et al.*, 2011). As propriedades de sinalização do peróxido de hidrogênio são atribuídas a sua relativa estabilidade, difusibilidade e reatividade seletiva, frequentemente apresentando-se como a molécula de sinalização redox mais importante (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; SIES, 2014). No entanto, o peróxido de hidrogênio atua como uma molécula sinalizadora ou leva ao dano oxidativo das biomoléculas, uma condição denominada estresse oxidativo, depende do contexto celular, de sua concentração local e da cinética de sua produção e eliminação (AUTEN; WHITE, 2009; LISMONT; REVENCO; FRANSEN, 2019).

### 1.5 Resposta ao dano do DNA

Considerando o que foi discutido até o momento, além da importância clínica do *T. cruzi* suas particularidades únicas o tornam um modelo excepcional para a compreensão de diversos processos biológicos. Destaca-se, por exemplo, a relevância do estudo do metabolismo de DNA em sua mitocôndria única, bem como a investigação de como o organismo responde aos Danos ao DNA (DDR) quando seu genoma é lesionado. Explorar esses aspectos específicos do *T. cruzi* pode fornecer informações valiosas e ajudar a entender diversos processos biológicos.

O DNA é uma molécula altamente suscetível a modificações por agentes endógenos e exógenos, e a manutenção de sua integridade é de extrema importância para a perpetuação da vida. Durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, o parasita é exposto a diferentes estresses que podem levar à instabilidade de seu DNA. Além disso, fatores endógenos inerentes, tais como as próprias DNA polimerases envolvidas no processo de replicação e reparo, produtos ou subprodutos do metabolismo, originados de reações de oxidação e hidrólise, podem levar a formação de lesões no DNA (CHATTERJEE; WALKER, 2017; FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006).

Para lidar com tais insultos, os organismos dispõem de um conjunto de vias de sinalização responsáveis por salvar o DNA contra lesões e instabilidades genômicas, conhecido como DDR. A DDR opera por meio de uma cascata de sinalização, coordenando os checkpoints do ciclo celular, a atividade transcricional, o recrutamento de proteínas e a ativação de vias específicas de reparo de DNA, dentre outros processos. Uma vez que o DNA tenha sido reparado e a replicação reiniciada, as células retomam a progressão do ciclo celular. Se os danos ou o estresse genômico não forem resolvidos, a DDR pode mediar a ativação de vias de senescência ou morte celular programada (BRANZEI; FOIANI, 2008; CICCIA; ELLEDGE, 2010; HARPER; ELLEDGE, 2007; LAGERWERF; VROUWE; OVERMEER; FOUSTERI; MULLENDERS, 2011). Embora o sequenciamento do genoma de *T. cruzi* tenha revelado que tais parasitos possuem ortólogos de componentes-chave da DDR, para alguns ainda não foram reportados homólogos putativos (BERRIMAN; GHEDIN; HERTZ-FOWLER; BLANDIN *et al.*, 2005; EL-SAYED; MYLER; BARTHOLOMEU; NILSSON; AGGARWAL; TRAN; GHEDIN; WORTHEY; DELCHER; BLANDIN; WESTENBERGER; CALER; CERQUEIRA; BRANCHE; HAAS; ANUPAMA; ARNER; ÅSLUND *et al.*, 2005).

O funcionamento da DDR é altamente controlado por diversos fatores e proteínas que são recrutadas e montadas em resposta ao tipo e quantidade de lesão gerada na célula. Apesar da contribuição mútua desses mecanismos, grande parte da sinalização é mediada por fosforilações. Nesse cenário, as cinases *Ataxia Telangiectasia Mutada* (ATM, da sigla em inglês *Ataxia-telangiectasia mutated*) e *Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3* (ATR, da sigla em inglês *Ataxia-telangiectasia and Rad3-related*) atuam como as principais proteínas transdutoras de sinal que coordenam a DDR. Ambas pertencem à família das cinases relacionadas à fosfatidilinositol 3-quinase (PIKKs, da sigla em inglês), as quais fosforilam alvos que contêm os aminoácidos serina (S)/treonina (T) seguidas por um glutamato (Q) (SMITH; JACKSON, 2010).

ATM é ativada, sobretudo, em resposta às quebras de fita dupla no DNA (DSBs do inglês), lesões formadas em condições de estresse oxidativo (GULERIA; CHANDNA, 2016) ou de exposição à radiação gama (CHATTERJEE; WALKER, 2017), por exemplo. Por outro lado, longos trechos de DNA de fita simples (ssDNA do inglês), os quais podem se originar em virtude do estresse replicativo, são um dos principais fatores responsáveis pelo início da cascata de sinalização de ATR (ZOU; ELLEDGE, 2003).

Apesar dos mecanismos clássicos de ativação distintos dessas cinases, ATM e ATR atuam de forma interligada na DDR (BLACKFORD; JACKSON, 2017; CICCIA; ELLEDGE, 2010;

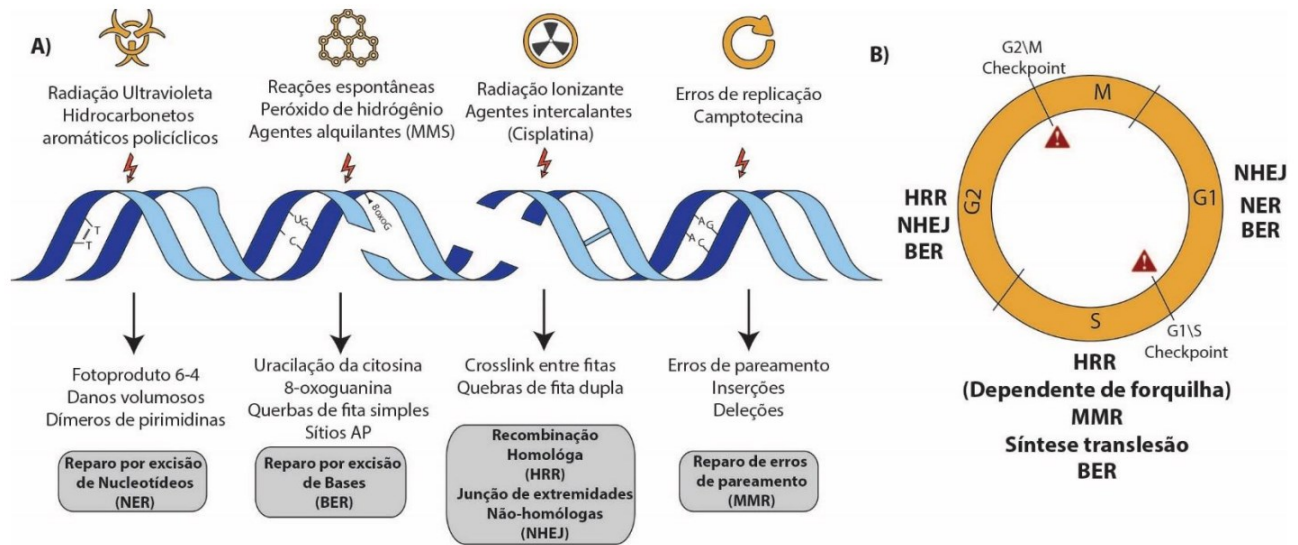
HARPER; ELLEDGE, 2007). Alguns estudos já demonstraram papéis funcionais de ATM e ATR nos tripanosomatídeos. Em *T. brucei*, o *knockdown* de ATM por RNAi é letal nas formas de vida presentes no hospedeiro mamífero (FORSYTHE, 2012), mas ainda não é claro como tal cinase opera na DDR neste parasito. Paralelamente, o *knockout* de ATR em *T. brucei* é letal. A depleção de tal cinase resulta em defeitos na segregação cromossômica, alterações na expressão gênica (BLACK; CROUCH; BRIGGS; LEMGRUBER *et al.*, 2021) e alteração no progressão do ciclo celular (MARIN; OBONAGA; PAVANI; DA SILVA *et al.*, 2020). Curiosamente, promastigotas de *L. major*, tratados com inibidores específicos de ATM e ATR, são mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio, revelando um dos papéis dessas cinases na tolerância ao estresse oxidativo (DA SILVA; MACHADO; RODRIGUES; PEDROSA, 2018). Além disso, a deleção de ATM em promastigotas de *L. mexicana* prejudica o ciclo de vida do parasito no inseto vetor (BAKER; CATTAPRETA; NEISH; SADLOVA *et al.*, 2021), sugerindo um papel de ATM no estabelecimento da infecção no hospedeiro invertebrado. Em *T. cruzi* já foram identificados ortólogos de ATM e ATR embora tenha sido possível gerar mutantes heminocautes para ATM em CL Brener, ainda não está clara a função dessa cinase no parasito (SILVA, 2019).

Vale ressaltar que a escolha correta das vias também depende, além da cascata de sinalização oriunda do DDR, do controle do ciclo celular. O momento em que essa célula se encontra é de extrema importância (Figura 8B) (BRANZEI; FOIANI, 2008). Esses sistemas atuam em conjunto para manter a homeostase celular (CHATTERJEE; WALKER, 2017; FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006).

### 1.5.1 Reparo de DNA

Ao longo da evolução dos organismos, foram selecionadas vias específicas para lidar com determinados tipos de lesões (HOEIJMAKERS, 2001), ocasionadas por diferentes fontes. Para cada tipo de fonte de dano ao DNA, existe um direcionamento para uma ou mais vias de reparo (Figura 8) (GIGLIA-MARI; ZOTTER; VERMEULEN, 2011).

Figura 8 — Fontes de dano ao DNA e principais vias de reparo



**Legenda:**

A) Diversas fontes de dano ao DNA ativam vias específicas de reparo de DNA. Dependendo do tipo de modificação de base ou lesão as vias de reparo podem ser ativadas para lidar com o dano;

B) As vias de reparo são dependentes do ciclo celular. Na figura estão representados, por fase do ciclo, as principais vias de reparo em cada fase do ciclo celular, além de ser destacado dois pontos de checkpoint que podem causar parada do ciclo celular dependente de dano ao DNA.

Fonte: Adaptado de Hoeijmakers, 2001.

Contudo, em situações nas quais os sistemas de reparo não conseguem lidar com os danos, os organismos podem ativar uma via de tolerância ao erro que permite a sobrevivência celular, ainda que a custo de mutações. Esse processo é denominado síntese translesão (TLS), que é realizado pelas DNA polimerases TLS. Estas DNA polimerases são específicas e podem replicar o DNA mesmo estando lesionado, o que permite a continuidade da replicação. DNA polimerases de síntese translesão possuem sítios catalíticos que acomodam pareamentos inespecíficos. Em rodadas seguintes de replicação, esses pareamentos errôneos, se não reparados posteriormente, podem resultar na fixação de mutações no DNA do organismo (PUTNAM, 2021; SALE, 2013). Apesar de as DNA polimerases TLS serem menos precisas, algumas dessas enzimas são capazes de replicar com fidelidade em frente a determinados tipos de lesão. Por exemplo, a DNA polimerase  $\eta$  é capaz de replicar o DNA corretamente, mesmo quando se depara com uma lesão causada por luz ultravioleta (UV) como os dímeros de ciclobutano (CPDs) (CHATTERJEE; WALKER, 2017; MCCULLOCH; KOKOSKA; MASUTANI; IWAI *et al.*, 2004; SARKAR; DAVIES; ULRICH; MCHUGH, 2006).

Quando um dano gera uma modificação de base, comumente causada por oxidação, desaminação ou alquilação, tem-se, preferencialmente, a ativação do reparo por excisão de

bases (BER, do inglês *base excision repair*). Essa via já foi descrita como a mais comumente utilizada na natureza, em conjunto com a via NER (NER, do inglês *nucleotide excision repair*) (HOEIJMAKERS, 2001).

A via do BER inicia-se pelo reconhecimento da lesão por uma classe de enzimas chamadas DNA glicosilases, que são capazes de catalisar a hidrólise da ligação N-glicosil entre as bases nitrogenadas danificadas e o esqueleto de ribose fosfato do nucleotídeo, formando um sítio apurínico/apirimidínico. Existem duas classes dessas glicosilases, as monofuncionais e as bifuncionais, e dependendo de qual enzima está atuando, essa via pode apresentar dois caminhos distintos. Quando se tem a atuação das monofuncionais, é ativada a sub-via *short-patch*, que retira apenas a base danificada e deixa o esqueleto de desoxirribose e fosfato. Já quando as bifuncionais atuam, tem-se a ativação da sub-via *long-patch* que, ao contrário da anterior, retira um conjunto de nucleotídeos além daquele danificado, deixando a extremidade 5' livre. Ambos os caminhos geram uma lacuna que será preenchida por uma DNA polimerase, seguido de uma ligação da recessão por DNA ligase, finalizando, assim, o processo de reparo (AKBARI; PEÑA-DIAZ; ANDERSEN; LIABAKK *et al.*, 2009; ALMEIDA; SOBOL, 2007; CHATTERJEE; WALKER, 2017; CHEN; FURANO, 2015; DIANOV; HÜBSCHER, 2013; ODELL; WALLACE; PEDERSON, 2013; TANG; SVILAR; TRIVEDI; WANG *et al.*, 2011).

Em *Trypanosoma cruzi*, vários genes da via do BER já foram caracterizados pela descrição de diversas classes de DNA glicosilases, (AGUIAR; FURTADO; REPOLÊS; RIBEIRO *et al.*, 2013; FURTADO; KUNRATH-LIMA; RAJÃO; MENDES *et al.*, 2012; KUNRATH-LIMA; REPOLÊS; ALVES; FURTADO *et al.*, 2017) como as responsáveis pelo sistema GO, que é específico para lidar com lesões comumente associadas à 8-oxoguanina, a lesão mais comum ocasionada pelo estresse oxidativo. Também foram caracterizadas DNA polimerases envolvidas no BER (DE OLIVEIRA LOPES; SCHAMBER-REIS; REGIS-DASILVA; RAJÃO *et al.*, 2008; SCHAMBER-REIS; NARDELLI; RÉGIS-SILVA; CAMPOS *et al.*, 2012), bem como outras endonucleases (VALENZUELA; SEPÚLVEDA; PONCE; GALANTI; CABRERA, 2018).

### 1.5.1.2 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

Quando há lesões volumosas que levam a alterações na estrutura tridimensional do DNA, ocorre a ativação da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Podemos citar alguns exemplos dessas lesões, como os dímeros de ciclobutano e os fotoprodutos 6-4 que são

causadas pela radiação UV. Os adultos de cisplatina também são lesões reparadas pelo NER (MARTEIJN; LANS; VERMEULEN; HOEIJMAKERS, 2014). O NER foi uma das primeiras vias de reparo a serem elucidadas em células de mamíferos, justamente por estar envolvido com o xeroderma pigmentoso (XP), uma doença que leva à predisposição para o câncer de pele. Além do XP, a deficiência do NER pode resultar, por exemplo, na síndrome de Cockayne, que também está associada a sensibilidade à radiação UV (FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006; VERMEULEN; FOUSTERI, 2013). Em humanos, essa via é subdividida em duas subvias principais, sendo uma acoplada ao processo de transcrição, denominada TC-NER; e a outra denominada via de reparo de genoma global, o GG-NER. Essa última detecta lesões por todo o genoma do organismo (HOEIJMAKERS, 2001; MARTEIJN; LANS; VERMEULEN; HOEIJMAKERS, 2014).

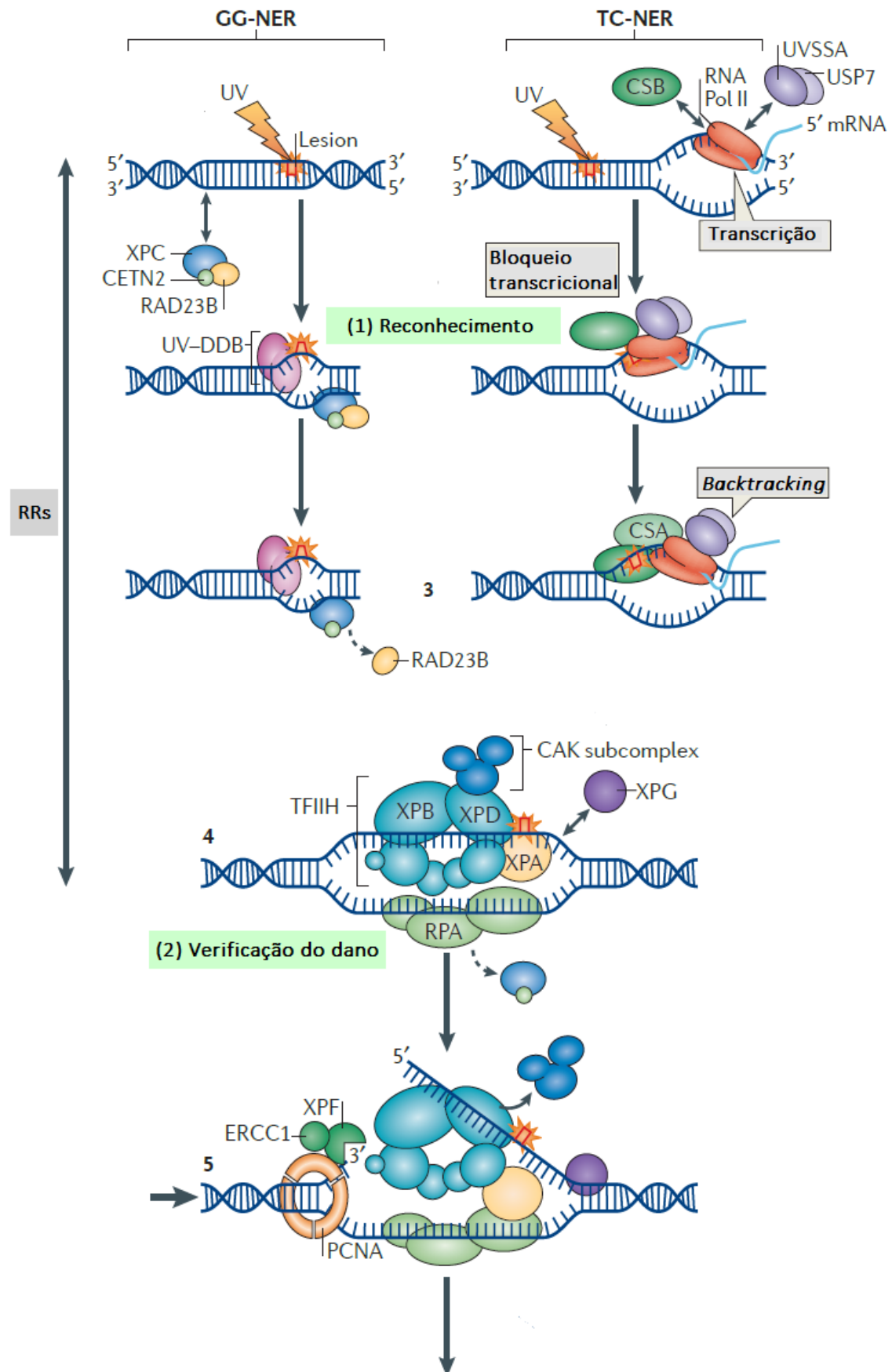
No GG-NER (Figura 9), o principal sensor de dano ao DNA é a proteína XPC (xeroderma pigmentoso, grupo de complementação C), associada com a proteína RAD23B e CETN2. Esse complexo é responsável por identificar um DNA de fita simples transitório (ssDNA) formado por mau pareamento decorrente de uma lesão volumosa no DNA (SCRIMA; KONÍČKOVÁ; CZYZEWSKI; KAWASAKI *et al.*, 2008; VAN DER SPEK; SMIT; BEVERLOO; SUGASAWA *et al.*, 1994). Após a ligação da XPC no DNA, o complexo II H (TFIIH) é recrutado. Esse complexo proteico é composto por 10 proteínas, divididas em dois subcomplexos, sendo um chamado CAK, (complexo ativador de cinase) que está envolvido no controle de transcrição e não atua no reparo de DNA. O segundo complexo, chamado de cerne, é onde se encontram as proteínas-chave do reparo, como as DNA helicases XPB e XPD. Em eucariotos superiores são identificadas outras cinco proteínas associadas (p62, p52, p44, p34 e p8/TTD).

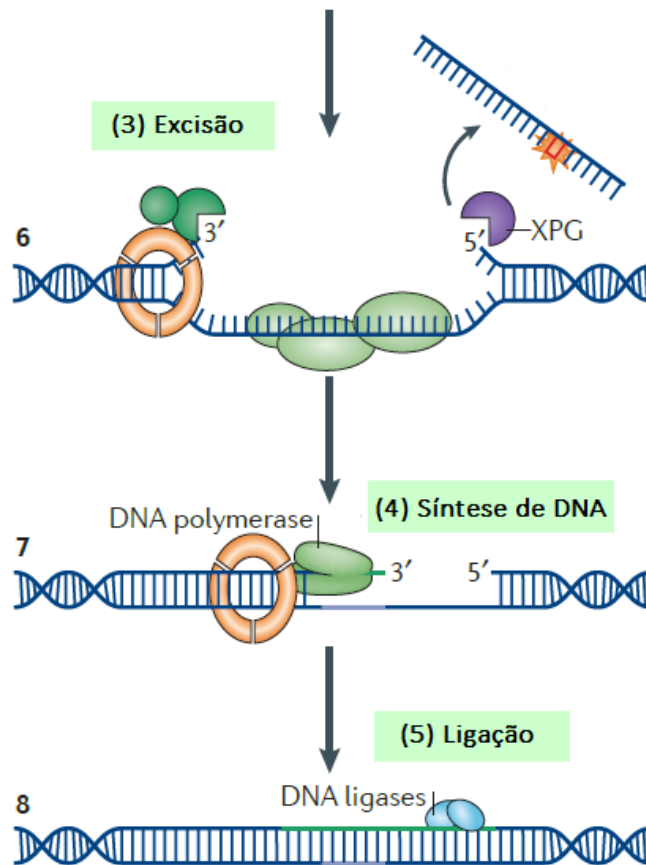
Após o recrutamento de TFIIH pela XPC, é descrito na literatura que o subcomplexo CAK se dissocia. As helicases XPB e XPD abrem a molécula de DNA (COMPE; EGLY, 2012; MARTEIJN; LANS; VERMEULEN; HOEIJMAKERS, 2014; YOKOI; MASUTANI; MAEKAWA; SUGASAWA *et al.*, 2000) e, após essa abertura, a próxima etapa consiste na retirada da lesão pela atuação de endonucleases específicas, XPF/ERCC1 e XPG, que cortam a fita danificada a uma curta distância nas direções 5'-3' da lesão (FAGBEMI; ORELLI; SCHÄRER, 2011). Posteriormente, as proteínas de replicação PCNA, RFC e uma DNA polimerase realizam o processo de preenchimento da lacuna gerada, sendo este finalizado por uma DNA ligase (Figura 9) (MOSER; KOOL; GIAKZIDIS; CALDECOTT *et al.*, 2007; OGI; LIMSIRICHAIKUL; OVERMEER; VOLKER *et al.*, 2010). A ativação do TC-NER (Figura

9), por sua vez, é dependente do reconhecimento de uma RNA polimerase II retida frente a um dano. A RNA polimerase é, então, reconhecida pela proteína CSB (Síndrome de Cockayne proteína B), seguido pela interação de CSA (Síndrome de Cockayne proteína A), sendo que estas são essenciais para o início da montagem dos outros componentes do TC-NER (FOUSTERI; VERMEULEN; VAN ZEELAND; MULLENDERS, 2006). Uma vez reconhecida a lesão pelo complexo CSA-CSB, esse primeiro tenta empurrar a RNA polimerase para continuar o processo de transcrição, caso não consiga irá, então, deslocar a RNA polimerase II do local da lesão num evento chamado de *backtracking*, recrutando, depois, o TFIIF. A partir dessa etapa, o reparo segue, então, os mesmos passos descritos anteriormente para o GG-NER (Figura 9) (CHATTERJEE; WALKER, 2017; MARTEIJN; LANS; VERMEULEN; HOEIJMAKERS, 2014).

Em *Trypanosoma cruzi*, a via do NER é quase completamente conservada, embora o sequenciamento do genoma tenha revelado algumas diferenças em relação a outros organismos. Por exemplo, foi possível observar a ausência de ortólogos para as proteínas RPA3 (componente do heterotrímero RPA), XPA, CSA e DDB2 (BERRIMAN; GHEDIN; HERTZFOWLER; BLANDIN *et al.*, 2005; EL-SAYED; MYLER; BARTHOLOMEU; NILSSON; AGGARWAL; TRAN; GHEDIN; WORTHEY; DELCHER; BLANDIN; WESTENBERGER; CALER; CERQUEIRA; BRANCHE; HAAS; ANUPAMA; ARNER; ÅSLUND *et al.*, 2005; IVENS; PEACOCK; WORTHEY; MURPHY *et al.*, 2005; PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010). Além disso, é possível identificar duas proteínas similares a XPB, nomeadas como TcXPB e TcXPBz, contudo apenas TcXPBz está envolvida no NER, enquanto TcXPB tem funções apenas nos processos de transcrição (BADJATIA; NGUYEN; LEE; GÜNZL, 2013; MACHADO; VIEIRA-DA-ROCHA; MENDES; RAJÃO *et al.*, 2014). Outra diferença perceptível é a ausência do complexo CAK em TFIIF que, em tripanossomatídeos, está associado a duas proteínas exclusivas desse grupo, denominadas TSP1 e TSP2 (LEE; JUNG; GÜNZL, 2009). Ademais, nessa família, ainda há a ausência da DNA ligase 3 (LIG3), o que indica que a via NER pode funcionar dependente da ligase 1 apenas (PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010).

Figura 9 — Representação esquemática simplificada do NER





Legenda: As principais proteínas envolvidas na via estão destacadas. O NER pode ser dividido em 4 etapas: reconhecimento do dano, verificação, excisão, síntese do DNA e ligação. As duas primeiras etapas são reversíveis. Uma vez que a dupla excisão na fita de DNA tenha sido catalisada por XPF e XPG, o processo torna-se irreversível. Legenda: RRs (reações reversíveis).

Fonte: Adaptada de Martejijn *et al.*, (2014).

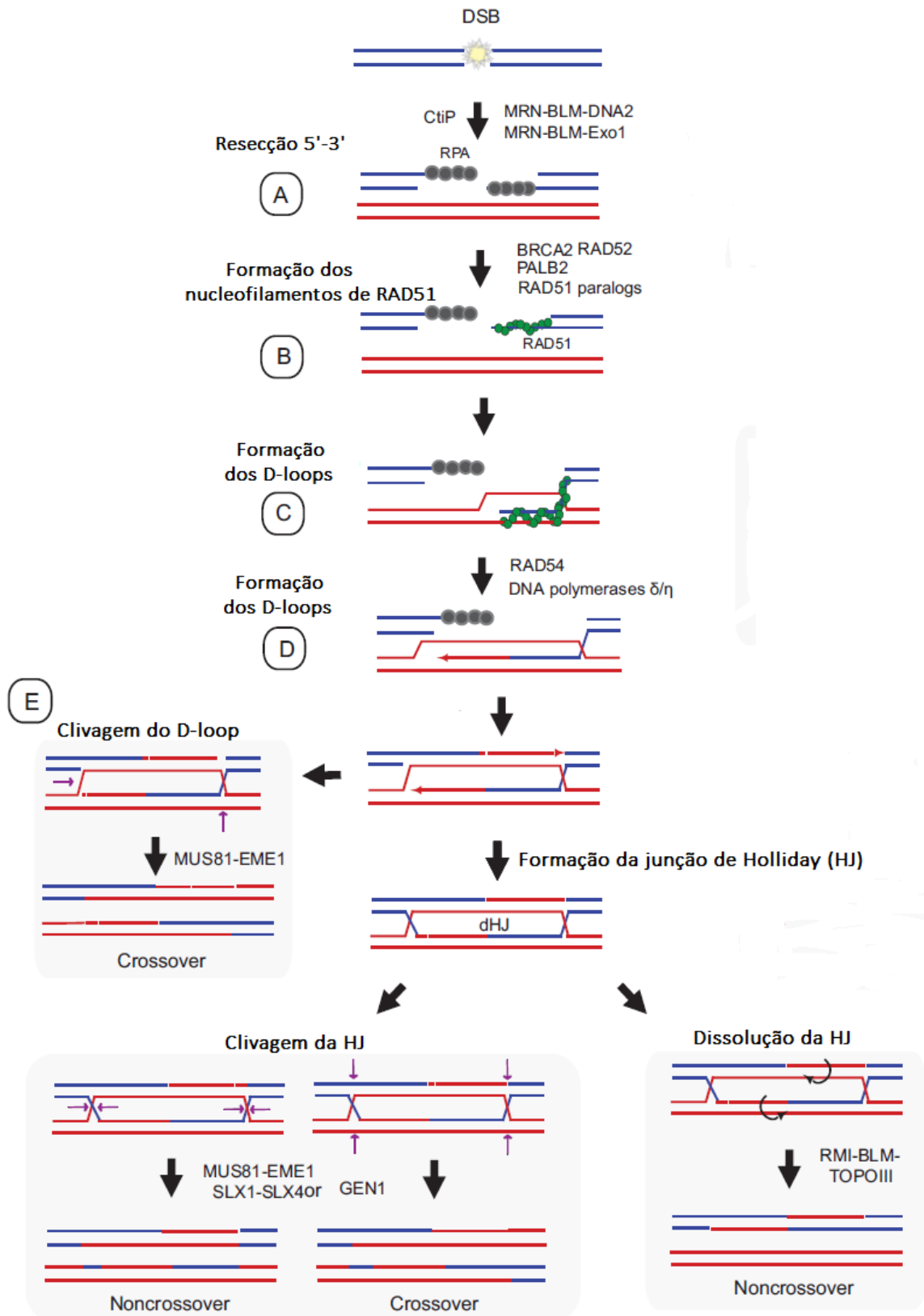
### 1.5.1.3 Reparo por recombinação homóloga

Lesões que geram quebras na dupla fita são citotóxicas e devem ser reparadas. Existem duas principais vias que podem ser ativadas frente a uma lesão desse tipo, sendo essas a recombinação homóloga (HR) e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) (PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). O *T. cruzi* não apresenta em seu genoma duas enzimas do NHEJ (DNA ligase IV e XRCC4), e evidências experimentais apontam para a ausência dessa via nesse organismo (COSTA-SILVA; RESENDE; UMAKI; PRADO *et al.*, 2021; PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010).

Em células de humanos o reparo por recombinação homóloga se inicia quando o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) reconhece e se liga a uma DSB (Figura 10), recrutando as proteínas ATM e TIP60 para o DNA (STRACKER; PETRINI, 2011; SUN; MCCORVIE; YATES; ZHANG, 2020). A ATM ativada fosforila a histona H2A, que é utilizada como âncora para o complexo MDC1 (BHATTI; KOZLOV; FAROOQI; NAQI *et al.*, 2011). Em seguida, o MDC1 ativado introduz as ligases E3 ubiquitina, formando um complexo Ligase E3 ubiquitinada-H2Ax, obtendo-se, então, um sítio de encaixe para 53BP1 e BRCA1 (ALTMAYER; LUKAS, 2013). Outros componentes importantes para o reparo são recrutados para o DNA, como as proteínas RPA e RAD51 (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Em seguida, é realizada a ressecção inicial do DNA pela atividade da endonuclease do MRN com o auxílio da CtIP. Isso favorece a ressecção de longo alcance pela EXO1 ou BLM, de aproximadamente 30 bases (CHEN; TYLER, 2008; NIMONKAR; GENSCHEL; KINOSHITA; POLACZEK *et al.*, 2011). Durante o processo, são gerados fragmentos de fita simples de DNA que são estabilizados pela proteína RPA (Figura 10A). Esta é substituída pela RAD51 (Figura 10B), gerando um filamento de nucleoproteína. Auxiliado pelas enzimas BRCA2 e PALB2, inicia-se o processo de invasão da dupla fita de DNA na fita homóloga adjacente, formando um D loop (Figura 10C) (HOLLOMAN, 2011; XU; ZHANG; XU; JI *et al.*, 2018), em que várias outras proteínas funcionam em cooperação nessa etapa.

Quando se encontra a homologia, as enzimas RAD54 e RAD54B removem a RAD51, permitindo que a extremidade 3' OH livre seja reconhecida pela DNA polimerase, o que possibilita a polimerização utilizando como molde a fita homóloga (Figura 10D) (MAZIN; MAZINA; BUGREEV; ROSSI, 2010; SEBESTA; BURKOVICS; JUHASZ; ZHANG *et al.*, 2013). Ao finalizar a polimerização, o DNA é ligado pela DNA ligase e é formada uma junção de *holliday*, sendo essa processada coletivamente pelo complexo BLM-TOPOIII-RMI1-RMI2, pela endonuclease GEN1 e pelo complexo MUS81-EME1 e SLX1-SLX4 (Figura 10E) (Chang, 2008; Ciccia, 2008; Fekairi, 2009; Rass, 2010; Xu, 2008).

Figura 10 — Representação esquemática simplificada da via de HR



- Legenda:
- A) A fita simples resultante do processamento da quebra de fita dupla é ocupada, inicialmente, pela proteína de ligação à fita simples, RPA.
  - B) Posteriormente, RPA é substituída pela proteína Rad51, através do auxílio do complexo Rad51/BRCA2.
  - C) O nucleofilamento invade a fita dupla do cromossomo homólogo e procura por homologia.
  - D) Pelo menos três vias podem ser sugeridas após o intermediário *D-loop* ser formado.
  - E) Em DSBR, ambas as extremidades de uma DSB estão envolvidas levando a formação das junções de Holliday. A junção pode ser processada por resolvases. Em SDSA, a fita invasora é deslocada após a síntese de DNA e anelada com a segunda extremidade, levando a uma conversão localizada. Em BIR, o *D-loop* é montado dentro de uma forquilha de replicação, copiando a parte distal inteira de um cromossomo resultando em perda de heterozigosidade.

Fonte: Adaptada de Genois et al., 2014.

O sequenciamento do genoma do *Trypanosoma cruzi* revelou que esse organismo possui os principais genes codificadores de proteínas envolvidos no início do reparo por recombinação homóloga, como Mre11, Rad50, Rad51, NSB1 e RPA. Semelhante ao *T. brucei*, o *T. cruzi* apresenta cinco parálogos de Rad51 (RAD51-3, RAD51-4, RAD51-5, RAD51-6, DMC1) (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2005) e, inclusive, foi mostrado que a enzima RAD51 desempenha um papel central na resposta à quebra de fita dupla e troca de material genético desse parasito e na geração de híbridos (ALVES; REPOLES; DA SILVA; MENDES *et al.*, 2018; PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010; REGIS-DA-SILVA; FREITAS; PASSOS-SILVA; FURTADO *et al.*, 2006). Além disso, foi mostrado que a enzima TcTopo3 $\alpha$ , descrita como atuante no final da via de reparo por recombinação homóloga, em conjunto com BLM, apresentou um papel crucial em lidar com lesões na dupla fita de DNA (COSTA-SILVA; RESENDE; UMAKI; PRADO *et al.*, 2021).

### 1.5.2 Reparo de DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial está sujeito aos mesmos tipos de danos que afetam o DNA nuclear, gerando vários tipos de lesões, incluindo alquilação, formação de sítios abásicos, formação de adutos, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e lesões oxidativas (ALENCAR; BATALHA; FREIRE; DE SOUZA-PINTO, 2019; STEIN; SIA, 2017). Devido ao papel mitocondrial na fosforilação oxidativa, o material genético das mitocôndrias é ainda mais exposto a espécies oxidantes (DAHALL; RAGHAVAN, 2021). Portanto, é relatado um acúmulo

no número de mutações no DNA mitocondrial, que é aproximadamente 10 vezes maior do que as observadas no núcleo (HOWELL, 1998; YAKES; VAN HOUTEN, 1997).

Inicialmente, acreditava-se que não existia um mecanismo de reparo para o DNA mitocondrial. Essa teoria perdurou devido a algumas evidências mal interpretadas, incluindo a natureza multicópia do genoma mitocondrial, a inexistência dos genes das vias de reparo em seu genoma e a ausência da via clássica do NER descrita por Clayton em 1974. Equivocadamente, ao longo de muitos anos, isso levou a modelos nos quais o mtDNA danificado era simplesmente degradado, em vez de ser reparado (DAHALL; RAGHAVAN, 2021; STEIN; SIA, 2017).

Contudo, nas últimas décadas de pesquisa sobre mitocôndrias foram reveladas múltiplas vias de reparo para o mtDNA. Mesmo assim, ao contrário do núcleo, cujas principais vias de reparo já foram bem elucidadas, ainda não está muito bem descrita a presença dessas vias para a manutenção da integridade do genoma mitocondrial. Dessa forma, embora sejam claras todas essas fontes de lesão, os mecanismos pelos quais elas são reparadas ainda não são bem compreendidos. Além disso, na maioria dos eucariotos, várias mitocôndrias estão presentes em uma única célula, o que permite uma tolerância para as mutações e um mau funcionamento de determinadas mitocôndrias, pois é compensado pelas mitocôndrias saudáveis (KOPINSKI; JANSSEN; SCHAEFER; TREFELY *et al.*, 2019). Todavia, quando essas falhas são múltiplas nas mitocôndrias, resultam em um mau funcionamento sistêmico (COPELAND; LONGLEY, 2014).

A alta produção de ROS, juntamente com a própria limitação da localização estrutural do mtDNA, faz com que as modificações de bases causadas por oxidações sejam o principal foco de dano ao mtDNA, e como consequência, o BER foi a primeira via a ser descoberta nas mitocôndrias (PETTEPHER; LEDOUX; BOHR; WILSON, 1991), sendo também a via mais bem caracterizada (ALENCAR; BATALHA; FREIRE; DE SOUZA-PINTO, 2019; ALEXEYEV; SHOKOLENKO; WILSON; LEDOUX, 2013). O BER funciona de forma muito semelhante em ambos os compartimentos, apresentando pequenas diferenças; no entanto, a regulação não está completamente elucidada (ALENCAR; BATALHA; FREIRE; DE SOUZA-PINTO, 2019).

As DSBs ocorrem nas mitocôndrias de mamíferos e geram fenótipos bem conhecidos, como a deleção (NISSANKA; BACMAN; PLASTINI; MORAES, 2018; SRIVASTAVA; MORAES, 2005). Não há certeza sobre a presença da via canônica do reparo por recombinação

homóloga em mitocôndrias como no núcleo; ainda assim, foi observado o fenótipo dessa via de reparo em mitocôndrias das células de ovário de hamster chinês (LEDOUX; WILSON; BEECHAM; STEVNSNER *et al.*, 1992). Estudos posteriores caracterizaram essa via utilizando diferentes organismos, como leveduras (LING; MAKISHIMA; MORISHIMA; SHIBATA, 1995) e humanos, através da caracterização de proteínas importantes (Rad51 e XRCC3), mostrando eventos clássicos de recombinação e como a depleção dessas proteínas-chave levou à perda desse reparo (DAHAL; RAGHAVAN, 2021; SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010). Outra forma de reparar as DSBs é o reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ). A presença dessa via também já foi relatada em mitocôndrias, porém ainda não se sabe ao certo quais são as enzimas envolvidas no processo. Até o momento, sabe-se que as enzimas clássicas dessa via não estão presentes na mitocôndria, demonstrando, portanto, que tal via é distinta da nuclear (COFFEY; LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999; LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999; TADI; SEBASTIAN; DAHAL; BABU *et al.*, 2016).

Uma via alternativa do NHEJ é a via de junção mediada por micro-homologia (MMEJ, do inglês *Microhomology-mediated end joining*). Ao contrário do NHEJ, que une diretamente as fitas quebradas, essa subvia utiliza sequências micro-homólogas para se alinhar e realizar o reparo, o que ocasionalmente resulta em mais erros do que o NHEJ. Várias enzimas dessa subvia foram identificadas na mitocôndria, como CtIP, FEN1, MRE11, PARP1 e Ligase III (TADI; SEBASTIAN; DAHAL; BABU *et al.*, 2016; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Mais recentemente, estudos também mostraram o papel da DNA polimerase  $\theta$  em MMEJ mitocondrial (WISNOVSKY; SACK; PAGLIARINI; LAPOSA; KELLEY, 2018). Assim, na ausência da via clássica do NHEJ, o MMEJ foi relatado como um dos principais mecanismos de reparo de quebra da dupla fita de DNA em mitocôndrias (TADI; SEBASTIAN; DAHAL; BABU *et al.*, 2016).

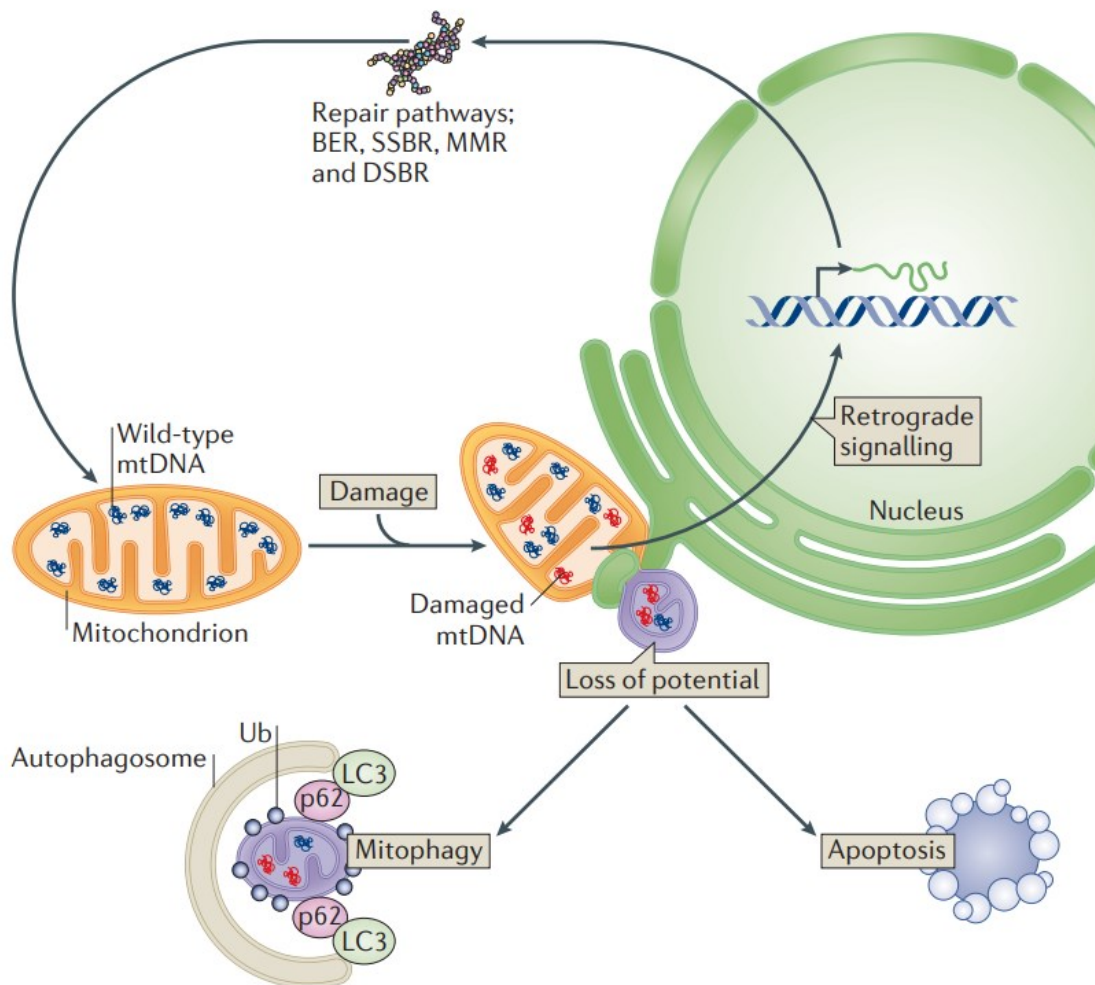
Trabalhos clássicos relataram a ausência do NER em mitocôndrias de mamíferos (B. PASCUCCI, 1997; CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974). Apesar dessa ausência, já foram descritas, na mitocôndria, proteínas dessa via atuando em funções não-canônicas, como o reparo por erros de pareamento, o reparo por recombinação homóloga e junção não homóloga, e, principalmente, atuando no BER (ALENCAR; BATALHA; FREIRE; DE SOUZA-PINTO, 2019; ALEXEYEV; SHOKOLENKO; WILSON; LEDOUX, 2013; POHJOISMÄKI; BOETTGER; LIU; GOFFART *et al.*, 2012). A primeira evidência de um papel mitocondrial para as proteínas envolvidas no NER foi a observação de que células deficientes de CSB tiveram a remoção de 8-oxoguanina prejudicada (STEVNSNER; NYAGA; DE SOUZA-

PINTO; VAN DER HORST *et al.*, 2002). Posteriormente, foi mostrada sua interação direta com OGG1 (KAMENISCH; FOUSTERI; KNOCH; VON THALER *et al.*, 2010), assim como foi demonstrado seu envolvimento na transcrição do mtDNA (BERQUIST; CANUGOVI; SYKORA; WILSON; BOHR, 2012). A deficiência dessa proteína em células humanas também foi associada a alterações nos processos de mitofagia (SCHEIBYE-KNUDSEN; RAMAMOORTHY; SYKORA; MAYNARD *et al.*, 2012), assim como no equilíbrio redox (PASCUCCI; LEMMA; IORIO; GIOVANNINI *et al.*, 2012). Outro componente do NER descrito nas mitocôndrias foi a observação de que XPD é recrutado para mitocôndrias de humanos logo após o estresse oxidativo e deficientes nessas proteínas acumulam mais deleções no mtDNA após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que foi revertido pela complementação da XPD (GOPALAKRISHNAN; LOW; TING; SRIKANTH *et al.*, 2010).

A presença do reparo de TLS na mitocôndria é muito controversa na literatura, e isso se deve à ausência de algumas proteínas envolvidas no TLS nuclear (DE SOUZA-PINTO; MASON; HASHIGUCHI; WEISSMAN *et al.*, 2009). No entanto, em camundongos foi mostrada uma significativa atividade de TLS (MASON; MATHESON; HALL; LIGHTOWLERS, 2003). Isso sugere que pode estar ocorrendo uma via alternativa nas mitocôndrias. Outra evidência que suporta essa hipótese é a presença de microssatélites no mtDNA, uma vez que se acredita que as TLSs colaboram com o seu surgimento (GOODMAN; WOODGATE, 2013). No entanto, para a elucidação dos mecanismos dessa via de reparo nas mitocôndrias; mais estudos ainda precisam ser realizados.

Se o dano ao mtDNA for irreparável, a célula pode optar por três caminhos distintos: degradação do mtDNA, degradação da própria mitocôndria defeituosa ou morte celular (Figura 11). Ao eliminar o DNA mitocondrial, pode ajudar a preservar a integridade do genoma mitocondrial, e isso só é possível devido à presença de várias mitocôndrias em uma única célula (KAZAK; REYES; HOLT, 2012). Quando pensamos no *T. cruzi*, a degradação mitocondrial não é uma alternativa viável devido à presença de sua única mitocôndria, o que nos leva a questionar como esse organismo lida com as lesões no seu DNA mitocondrial.

Figura 11 — Efeito da manutenção do DNA mitocondrial na homeostase mitocondrial



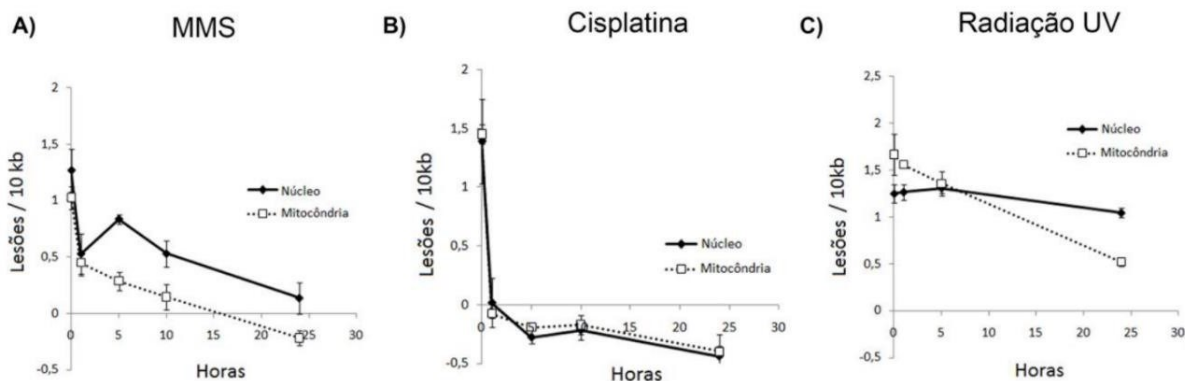
Legenda: Danos ao mtDNA podem se acumular, resultando em mtDNA mutado (vermelho). Os danos ao mtDNA podem ser reparados pelas vias de reparo, como reparo por excisão de base (BER), reparo de quebra de fita simples (SSBR), reparo de incompatibilidade (MMR) ou reparo de quebra de fita dupla (DSBR). Se as lesões no mtDNA persistir, regiões da rede mitocondrial podem perder potencial de membrana (roxo). As mitocôndrias danificadas podem ser removidas através da mitofagia. Se uma proporção substancial de mitocôndrias estiver danificada ou esgotada do seu mtDNA, pode ocorrer apoptose. Mitocôndrias com carga mutante aumentada que escapam do engolfamento pelos autofagossomos podem sinalizar para outros compartimentos celulares (sinalização retrógrada), como o núcleo, para aumentar a expressão de genes envolvidos no reparo do mtDNA.

Fonte: Adaptado de Kazak, 2012.

Em *T. cruzi*, nosso grupo já descreveu algumas proteínas e fenótipos relacionados ao reparo do DNA mitocondrial. Para diversos agentes genotóxicos utilizados, foi comprovado que existe uma cinética de reparo distinta para o núcleo e a mitocôndria, detectadas por meio da técnica de qPCR que quantifica lesões. Assim, foi mostrado que essas células conseguem

lidar com lesões que ocorrem no kDNA. O reparo demonstrado foi proveniente de lesões ocasionadas por exposição ao peróxido de hidrogênio, cisplatina, radiação ultravioleta e o agente alquilante metanossulfonato de metila (MMS) (RAJAO, 2011; REPOLÊS, 2019). Quando expostas à cisplatina (Figura 12.B), as células apresentaram uma cinética de reparo similar entre o núcleo e a mitocôndria, com uma queda rápida de lesões após a primeira hora. Um fenótipo de reparo inicial rápido foi visto também quando as células foram tratadas com MMS (Figura 12.A). No entanto, quando as células foram submetidas a  $1500\mu\text{J}/\text{m}^2$  de radiação UV-C (Figura 12.C), no núcleo não houve um reparo de lesões significativo; inclusive, observa-se um pequeno aumento no número de lesões até 6 horas após o tratamento. Contudo, na mitocôndria, observa-se um reparo mais eficiente, representado por uma queda constante na quantidade de lesões (RAJAO, 2011).

Figura 12 — Cinética de reparo de lesões nDNA e kDNA em *T. cruzi*



Legenda: Ensaios de qPCR investigando a cinética de reparo frente à exposição por:

- A) MMS;
- B) cisplatina;
- C) radiação ultravioleta tipo C (UV-C);

Como mostrado na figura, para estes três tipos de dano, o parasito é capaz de reparar o genoma mitocondrial e nuclear, ainda que com eficiências distintas para cada um dos tratamentos.

Fonte: Adaptada de Rajão, 2011.

Também foi observado que, após o tratamento com peróxido de hidrogênio, o *T. cruzi* acumula menos danos no DNA mitocondrial em comparação ao DNA nuclear (KUNRATH-

LIMA; REPOLÊS; ALVES; FURTADO *et al.*, 2017; REPOLÊS, 2019). Além disso, já foram colocalizadas importantes proteínas da via de reparo BER na mitocôndria do *T. cruzi*, principalmente em resposta ao estresse oxidativo, como homólogos de MutY e OGG1, que fazem parte do sistema GO, uma via do BER específica para lidar com a presença de 8-oxoguanina (8oxoG) (DE OLIVEIRA LOPES; SCHAMBER-REIS; REGIS-DA-SILVA; RAJÃO *et al.*, 2008; SCHAMBER-REIS; NARDELLI; RÉGIS-SILVA; CAMPOS *et al.*, 2012). Assim como foi mostrado que a superexpressão da proteína TcOGG1 reduziu os níveis de dano e de 8oxoG no kDNA do parasito (FURTADO; KUNRATH-LIMA; RAJÃO; MENDES *et al.*, 2012), também foi demonstrada a presença de TcMYH nessa estrutura (KUNRATH-LIMA; REPOLÊS; ALVES; FURTADO *et al.*, 2017). Além disso, o nosso grupo mostrou a existência de diversas DNA polimerases presentes no cinetoplasto de *T. cruzi*, a DNA polimerase  $\kappa$  localizada nos sítios antipodais do cinetoplasto, em que demonstrou um papel em intermediários de replicação, além do seu envolvimento no reparo de quebras de dupla fita de DNA (DE MOURA; SCHAMBER-REIS; PASSOS SILVA; RAJAO *et al.*, 2009; RAJAO, 2011). Além da polimerase  $\kappa$ , duas polimerases foram localizadas na mitocôndria, sendo estas a DNA polimerase  $\beta$  e  $\beta$ -PAK, que foram associadas à replicação do kDNA e à resposta a lesões oxidativas. A DNA Pol  $\beta$ -PAK é capaz de realizar a síntese translesão frente à 8oxoG presente no kDNA, e a superexpressão dessas DNA polimerases levou à redução da quantidade de 8oxoG presente nessa estrutura (DE OLIVEIRA LOPES; SCHAMBER-REIS; REGIS-DA-SILVA; RAJÃO *et al.*, 2008; SCHAMBER-REIS; NARDELLI; RÉGIS-SILVA; CAMPOS *et al.*, 2012). Dados mais recentes revelaram um papel relevante de TcRad51 em lidar com a quebra de dupla fita de DNA na mitocôndria, mostrando assim mais uma evidência da presença do reparo por recombinação homóloga nessa organela em *T. cruzi* (FERREIRA, 2019).

## 1.6. Fontes exógenas de dano ao DNA

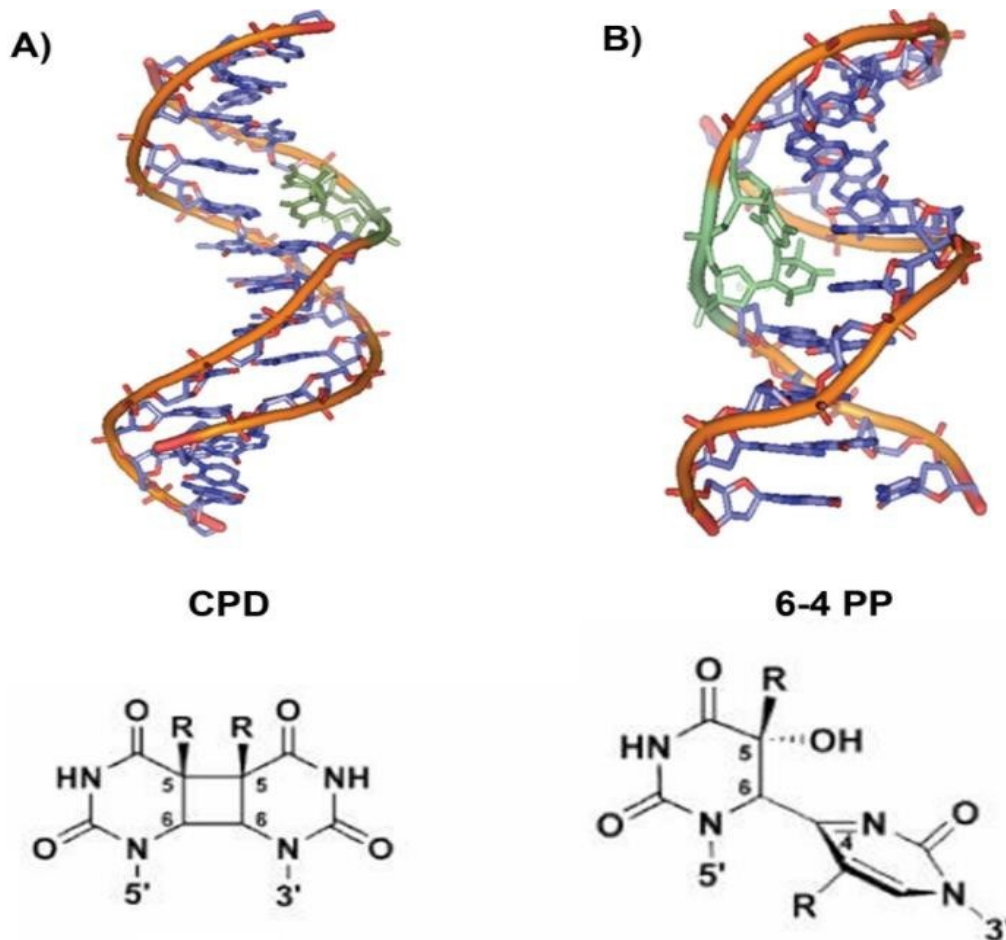
Uma das abordagens para o estudo do reparo de DNA é a utilização de agentes genotóxicos exógenos, com o intuito de mimetizar os danos no organismo de interesse. Como as vias de reparo são ativadas dependendo do tipo de lesão, é possível, então, estimular expressivamente a ativação da via de interesse, que seria pouco ativa em condições basais. Em conjunto, a realização de nocautes e superexpressores dos genes candidatos ao envolvimento na via estudada, ajuda a elucidar o mecanismo biológico. Para uma melhor compreensão dessa tese, serão descritos os mecanismos de ação dos agentes genotóxicos utilizados: UV-C, cisplatina e doxorubicina.

### 1.6.1 Radiação ultravioleta C (UV-C)

A radiação ultravioleta é uma importante fonte de danos ao DNA, além de ser bem descrita como ativadora da via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (FRIEDBERG, 2011; HOEIJMAKERS, 2001). Tal radiação é subdividida em três espectros: UV-A, que está entre os comprimentos de onda de 320nm a 400nm; UV-B, de 295nm a 320nm; e a radiação UV-C, de 100nm a 295nm, sendo este o comprimento de onda mais explorado, justamente por se enquadrar dentro do pico de absorção de radiação do DNA, que é de 260nm (MITCHELL; JEN; CLEAVER, 1991). Além da UV-C, as radiações UV-A e UV-B podem ser absorvidas por moléculas que, quando excitadas, também podem causar lesões no DNA. Uma vez que a luz solar é rica nesses dois comprimentos de onda, e considerando a contínua exposição dos organismos a essa radiação, isso a torna uma importante fonte ambiental de mutagênese (CHATTERJEE; WALKER, 2017; DAVIES, 1995). A exposição da molécula de DNA ao UV-C pode levar à formação de fotoprodutos a partir da ligação de duas pirimidinas adjacentes. Dentre as lesões formadas, podemos destacar as duas principais relacionadas aos danos no DNA, que são os dímeros de ciclobutano (CPD), mais comum, e o fotoproduto 6-4 (6-4PP) (Figura 13). Ambos os tipos são capazes de causar distorções na hélice de dupla fita de DNA (MITCHELL; JEN; CLEAVER, 1991).

O NER é a via mais importante e descrita para lidar com as lesões CPDs e 6-4PPs geradas por UV-C. Como já descrito, é subdividido em duas subvias (GG-NER e TC-NER), ambas as vias removem essas lesões de uma forma sequencial que inclui reconhecimento de danos, abertura da dupla hélice de DNA no local do dano, e incisões duplas em ambos os lados da lesão seguida de ressíntese e ligação. Já foi descrito que em células de mamíferos como humanos e hamster, a eliminação de 6-4PP é pelo menos cinco vezes mais rápida que a de CPDs (RASTOGI; RICHA; KUMAR; TYAGI; SINHA, 2010; VAN HOFFEN; VENEMA; MESCHINI; VAN ZEELAND; MULLENDERS, 1995).

Figura 13 — Modificações no DNA causadas pela radiação UV



Legenda: As duas principais modificações causadas pela exposição do DNA à radiação UV.

A) O dímero de ciclobutano (CPD) é o tipo de lesão mais comum decorrente desta exposição;

B) Fotoproduto 6-4;

Fonte: Adaptado de Hoeijmakers, 2011.

### 1.6.2 Cisplatina

O químico italiano Michele Peyrone relatou pela primeira vez a síntese da cisplatina em 1844 (PEYRONE, 1844), mas sua atividade biológica foi demonstrada pela primeira vez em 1965 por Barnett Rosenberg (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965), que tentava estudar o efeito de correntes elétricas no crescimento bacteriano. Foi aprovada como um agente anticancerígeno somente em 1978 nos EUA e um ano depois na Europa (ROTTENBERG; DISLER; PEREGO, 2021). Com o tempo, os medicamentos à base de Pt permanecem como um dos principais agentes quimioterápicos e como um dos mais utilizados na clínica. Sua

atividade antitumoral é devida ao seu efeito citotóxico nas células de replicação rápida, sendo classificado como um agente alquilante bifuncional, apesar de não causar alquilação, o composto tem a capacidade de se ligar no N7 ou O6 de purinas, que são pontos clássicos de alquilação (ROTTENBERG; DISLER; PEREGO, 2021; SIDDIK, 2003). Contudo, já foi descrita sua capacidade de geração de radicais superóxido (MASUDA; TANAKA; TAKAHAMA, 1994).

O mecanismo de ação da cisplatina é extensivamente caracterizado como prejudicial ao DNA. Seu modo de ação consiste em causar ligações cruzadas tanto em intrafitas quanto entre fitas no DNA (Figura 14), ambos levam à geração de adutos capazes de distorcer a estrutura tridimensional do DNA. Isso, por sua vez, resulta no bloqueio da transcrição e replicação (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; SORENSON; EASTMAN, 1988). A determinação de qual aduto será formado é dependente da orientação da fita de DNA em relação ao átomo de platina, da sequência de DNA e da dose utilizada (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; SIDDIK, 2003; WANG; LIPPARD, 2005). As formas mais comuns de danos encontrados no DNA são *crosslinks* intrafitas 1, 2 ApG e GpG, que correspondem em até 90% do efeito do quimioterápico (Figura 14) (HUANG; LI, 2013; SIDDIK, 2003). Todas essas modificações são capazes de causar grandes distorções na dupla-hélice de DNA, o que leva à parada tanto das forquilhas de replicação quanto da transcrição (SIDDIK, 2003).

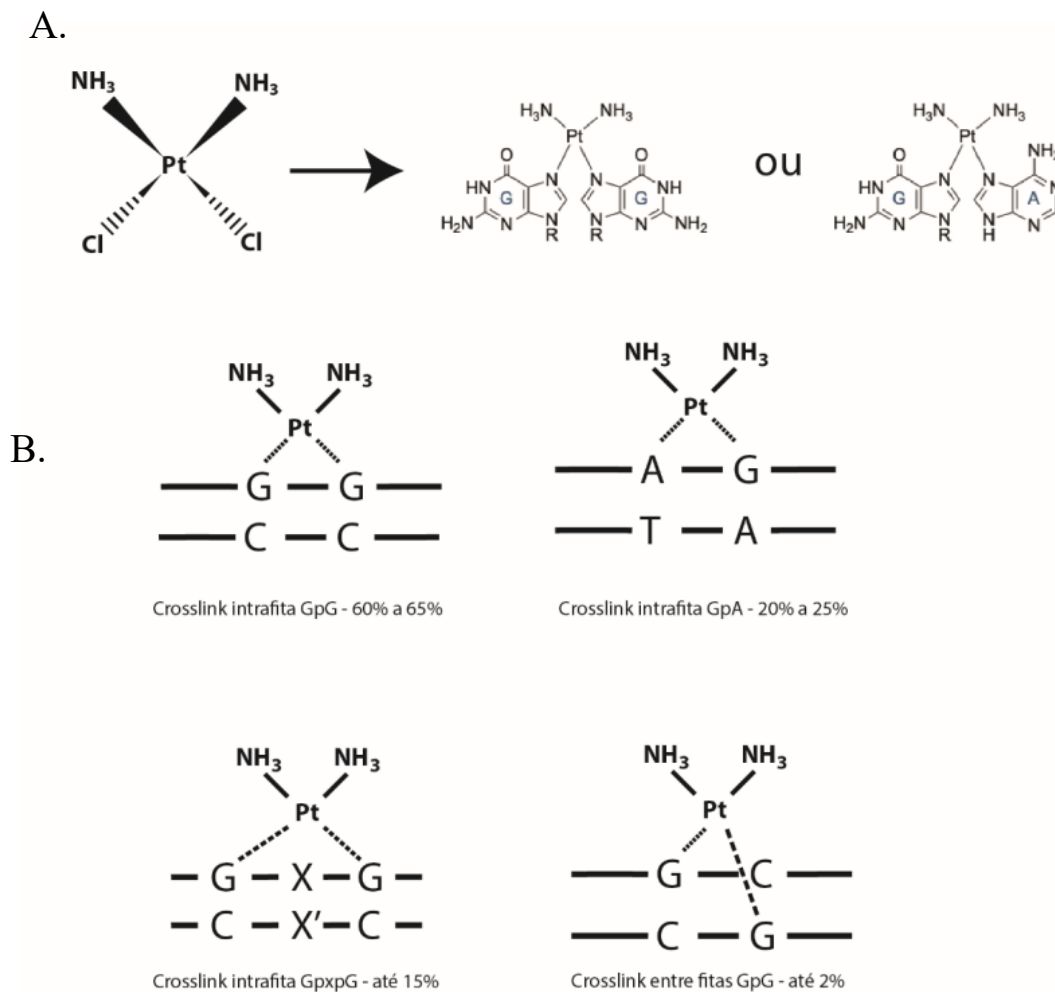
Esse bloqueio do processo de transcrição e replicação ativa várias vias de transdução de sinal, inclusive levando ao envolvimento de vias que atuam no reconhecimento e reparo de DNA, desencadeando, assim, a parada do ciclo celular e induzindo principalmente a apoptose nas células. As respostas causadas pela cisplatina são, portanto, variadas e envolvem várias proteínas de reparo quanto vias de sinalização específicas (EASTMAN, 1990).

Os adutos DNA-cisplatina são reparados, principalmente, pelo reparo por excisão de nucleotídeos (WANG; LIPPARD, 2005). Contudo, a cisplatina pode levar em menor quantidade uma lesão de *crosslink* entre fitas, ligando as duas fitas de DNA. O reparo para lidar com essa lesão é mais trabalhoso e envolve mais de uma via de reparo. Para esse tipo de dano, é necessário um processo de iniciação, o desacoplamento entre as duas fitas, uma síntese pelo local de lesão (pela via de síntese translesão), o envolvimento do reparo por excisão de nucleotídeos e, por fim, a recombinação homóloga (HUANG; LI, 2013).

Esses processos descritos são bem estudados envolvendo o dano do DNA nuclear, que se não reparados culminam na morte celular por apoptose, principalmente pela liberação do

citocromo C a partir das mitocôndrias. Contudo, o DNA mitocondrial também é severamente afetado pela cisplatina, levando à alteração de sua replicação e transcrição (PODRATZ; KNIGHT; TA; STAFF *et al.*, 2011), e sua relevância na indução da morte celular é pouco investigada. Estudos têm relacionado que a perda do mtDNA está diretamente associada a um aumento da sensibilidade à apoptose induzido por cisplatina (LIANG; ULLYATT, 1998), e que o efeito citotóxico da cisplatina é também mediado através da ação direta das mitocôndrias, embora ainda não esteja claro quais são os mecanismos envolvidos. Na literatura, já foi descrito haver um aumento significativo na expressão de TFAM e TIMM23 e, conseqüentemente, um aumento na geração das espécies reativas de oxigênio (KLEIH; BOPPLE; DONG; GAISLER *et al.*, 2019; MARULLO; WERNER; DEGTYAREVA; MOORE *et al.*, 2013), mas nenhum estudo ainda apresentou a contribuição do mtDNA nessa resposta.

Figura 14 — Danos causados pela exposição do DNA à cisplatina



Legenda: A) Estrutura da cisplatina e os dois principais tipos de ligações que ela é capaz de realizar na molécula de DNA, tanto frente à uma adenina quanto à uma guanina (à direita). Em contato com

o DNA a cisplatina é capaz de interagir com a posição 7 destas purinas e, desta forma, formar adutos de DNA que bloqueiam tanto a transcrição quanto a replicação;

B) Principais consequências da ligação de cisplatina na dupla fita de DNA. Os dois tipos de danos mais comuns são os adutos intrafitas GpG e GpA (duas estruturas superiores). Estes dois tipos de adutos são os mais comuns causados pela droga, podendo totalizar até 90% de todos os danos causados. Nas duas estruturas da parte inferior da figura estão dois outros adutos possíveis de serem formados pela droga. O crosslink intrafitas GpxpG que pode corresponder a até 15% dos adutos formados; e o crosslink entre fitas, que pode corresponder a até 2% dos danos gerados pela droga.

Fonte: Adaptado de Repolês, 2018.

### 1.5.3 Doxorubicina

A doxorubicina (Dox) (Figura 15), aprovada para uso médico nos Estados Unidos em 1974 para o tratamento de alguns tipos de câncer, foi originalmente descoberta como sendo produzida pela bactéria *Streptomyces peucetius* (CARVALHO; SANTOS; CARDOSO; CORREIA *et al.*, 2009). Pertencente à classe das antraciclinas, a Dox possui uma variedade de mecanismos celulares e uma potente atividade citotóxica, tornando-se atualmente um dos principais quimioterápicos em uso clínico (KCIUK; GIELECINSKA; MUJWAR; KOLAT *et al.*, 2023). Seu principal mecanismo de ação é a capacidade de intercalar no DNA, formando ligações de hidrogênio, principalmente em guaninas adjacentes a citocinas (GC) (LIPSCOMB; PEEK; ZHOU; BERTRAND *et al.*, 1994). A indução de danos causados por Dox é dividida em três principais mecanismos: formação de adutos no DNA, indução de quebra de fita simples (SSB) e dupla (DSB) e, por último, seu principal mecanismo de ação é a inibição da topoisomerase II, ligando-se a ela e formando um complexo Topo-Dox-DNA, que interrompe a replicação e a transcrição. Se não for reparado, pode induzir o processo de morte celular por apoptose (COLDWELL; CUTTS; OGNIBENE; HENDERSON; PHILLIPS, 2008; FORREST; SWIFT; REPHAELI; NUDELMAN *et al.*, 2012; SWIFT; REPHAELI; NUDELMAN; PHILLIPS; CUTTS, 2006).

A Dox leva à ativação da DDR, e, conseqüentemente, à ativação das quinases ATR e ATM, que fosforilam as quinases de checkpoint CHK1 e CHK2, culminando na ativação da apoptose (KCIUK; MARCINIAK; KONTEK, 2020; TSANG; CHAU; KONG; FUNG; KWOK, 2003). Além disso, já foi descrito a Dox tem a capacidade de se ligar diretamente à cardiolipina na membrana mitocondrial interna (GOORMAGHTIGH; HUART; PRAET; BRASSEUR; RUYSSCHAERT, 1990), iniciando um processo de alta produção de peróxido de hidrogênio e superóxido, seguido de despolarização da membrana mitocondrial, levando à liberação do citocromo C e, conseqüentemente, à ativação de caspases-3 levando a apoptose

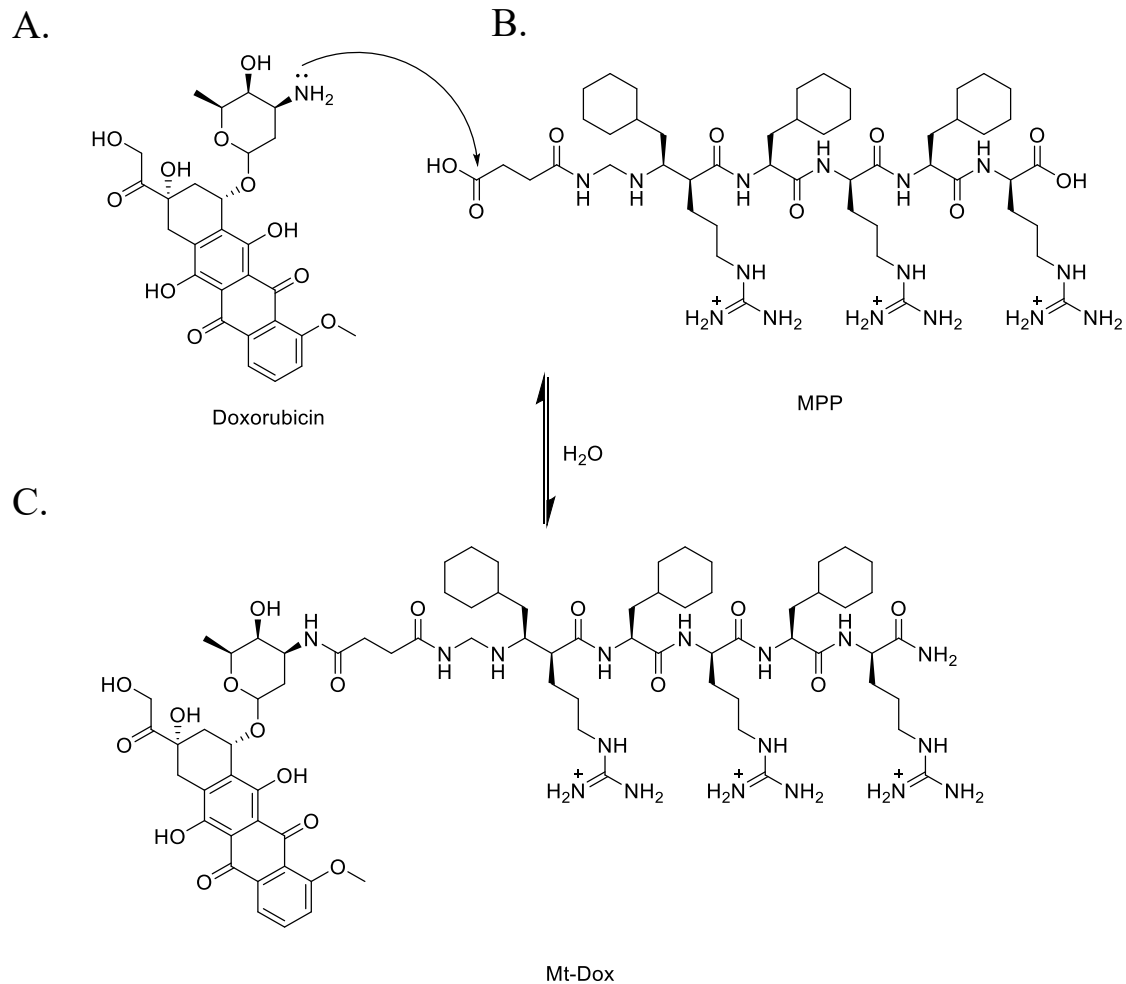
independente das lesões no DNA (GILLIAM; MOYLAN; PATTERSON; SMITH *et al.*, 2012; GORINI; DE ANGELIS; BERRINO; MALARA *et al.*, 2018; TSANG; CHAU; KONG; FUNG; KWOK, 2003).

No entanto, existem estudos que mostram que a Dox não leva à formação de lesões no DNA mitocondrial (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013), tendo como alvo principal o DNA nuclear em células de eucariotos (JEAN; TULUMELLO; RIGANTI; LIYANAGE *et al.*, 2015; POMMIER; SUN; HUANG; NITISS, 2016; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016).

Alguns cânceres são resistentes à Dox, principalmente os cânceres que superexpressam a bomba de efluxo de glicoproteína P (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013; SZAKACS; PATERSON; LUDWIG; BOOTH-GENTHE; GOTTESMAN, 2006). Para contornar os mecanismos de resistência, e visando aumentar a citotoxicidade da Dox, o laboratório da Dra. Shana O. Kelley desenvolveu um transportador sintético baseado em peptídeos que direciona seletivamente uma variedade de compostos para as mitocôndrias (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013; FONSECA; PEREIRA; MOURTADA; GRONDA *et al.*, 2011; HORTON; PEREIRA; STEWART; FONSECA; KELLEY, 2012; HORTON; STEWART; FONSECA; GUO; KELLEY, 2008; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Acoplado, então, esse peptídeo à Dox e direcionando assim esse agente genotóxico exclusivamente para a mitocôndria (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013).

Esse peptídeo foi chamado de peptídeo penetrador de mitocôndria (MPP, do inglês *mitochondria-penetrating-peptide*), que foi ligado à Dox, formando um composto denominado doxorubicina-alvo-mitocôndria (mt-Dox) (Figura 15). A sequência peptídica foi projetada utilizando a sequência Fx-r-Fx-r-Fx-r (Fx = ciclohexilalanina, r = d-arginina) mostrado na Figura 15; em que a ciclohexilalanina foi pensada para introduzir hidrofobicidade com o objetivo de facilitar a penetração nas membranas mitocondriais. A adição da arginina, com suas cargas catiônicas, favorece a captação através da barreira energizada da mitocôndria. Esse peptídeo apresenta uma tendência a formar uma  $\alpha$ -hélice anfifílica, sendo totalmente composto por aminoácidos artificiais que o tornam resistente à degradação intracelular (FONSECA; PEREIRA; MOURTADA; GRONDA *et al.*, 2011; HORTON; STEWART; FONSECA; GUO; KELLEY, 2008).

Figura 15 — Representação resumida de obtenção de mt-Dox



Legenda: A) Estrutura da doxorubicina;  
 B) Estrutura do MPP, a representação do sítio de acoplamento com liberação de água;  
 C) Mt-Dox

Fonte: De autoria própria.

Em comparação ao composto sem direcionador, o mt-Dox teve uma distribuição exclusivamente mitocondrial, resultado confirmado por técnicas de imunofluorescência e colocalização com marcadores mitocondriais, e pela ausência de lesões nucleares dessas células. O tratamento com esse agente genotóxico gerou lesões exclusivamente no mtDNA e, como consequência, levou à perda do potencial de membrana das mitocôndrias, causando seu mau funcionamento (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013).

## 1.7 Justificativa

As evidências até aqui levantadas sugerem, portanto, que há, sim, vias de reparo associadas ao cinetoplasto do *T. cruzi*. Com isso o principal objetivo deste trabalho foi de estudar proteínas relacionadas ao reparo acoplado ao processo de transcrição e recombinação no kDNA desse organismo. Para avaliar o reparo por recombinação homóloga nas mitocôndrias de *T. cruzi*, avaliamos as proteínas TcRad51 e TcTopo3 $\alpha$ , que são classicamente descritas na por atuarem no reparo por recombinação homóloga no núcleo. Para investigar o reparo acoplado ao processo de transcrição, investigamos se a proteína CSB está também associada a esse reparo na mitocôndria, assim como a investigação de uma proteína exclusiva do cinetoplasto, TcKap7. Para isso analisamos a sobrevivência e o crescimento de células mutantes para essas proteínas, além da cinética de reparo desses mutantes em comparação com a cepa selvagem, utilizando diferentes agentes genotóxicos que levam à formação de lesões reparadas por ambas as vias. Também investigamos as diferenças nas respostas entre o núcleo e a mitocôndria com o uso de um agente genotóxico específico para mitocôndrias. Avaliamos se esses tratamentos provocaram alterações no processo transcricional mitocondrial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Compreender o reparo de lesões que comprometem o processo de transcrição do DNA mitocondrial em *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, buscamos responder às seguintes perguntas:

- Investigar o envolvimento de Topo3a, Tobo3b e TcRad51 no reparo por recombinação homóloga no kDNA;
- Estudar o papel da proteína KAP7 no reparo de lesões que afetam a transcrição no kDNA;
- Estudar a função da proteína CSB no reparo acoplado à transcrição no kDNA do *T. cruzi*;
- Estudar os mecanismos de sinalização de morte após lesões no DNA mitocondrial.

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo dos parasitos

As linhagens utilizadas neste projeto foram cultivadas na forma de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* e mantidas a 28°C em meio *liver infusion-tryptose* (5g.L-1, NaCl 4g.L-1, bactotriptose 5g.L-1, KCl 0,4g.L-1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8g.L-1, dextrose 2g.L-1, hemin 0,2% 10ml em NaOH 0,05M pH 7.3), suplementado com 7,5% de soro fetal bovino, 500.000 u/L de penicilina e 0,2g/L de sulfato de estreptomicina, juntamente com os antibióticos específicos para cada linhagem. A concentração final desses antibióticos foi ajustada para 200 µg/mL de G418 (Geneticin – Gibco) e 200 µg/ml de higromicina (Sigma-Aldrich). As linhagens utilizadas compreenderam a cepa CL Brener, DM28C, nocaute do gene Tckap7 (MORINI, 2015), nocaute para os genes TcTopo3a e TcTopo3B, superexpressora e heminocaute de TcCSB (MENDES, 2015).

#### 3.2 Curvas de sobrevivência na presença de agentes genotóxicos

Culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com diferentes doses de agentes genotóxicos. Posteriormente, a sobrevivência das culturas foi determinada por meio da contagem de células vivas em uma câmara citométrica em diferentes momentos, na presença do corante vital eritrosina. A porcentagem de sobrevivência foi calculada comparando a densidade celular das culturas tratadas com a densidade das culturas controle não tratadas, cultivadas sob as mesmas condições.

##### 3.2.1 Tratamento com Radiação UV-C

Para o tratamento com radiação ultravioleta-C (UV-C), foram coletados 5 mL de cada cultura em fase exponencial de crescimento ( $1 \times 10^7$  células/mL). As amostras foram então dispostas em uma camada fina sobre uma placa de Petri e expostas à luz ultravioleta no equipamento Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene), utilizando uma dose de 1500 µJ/m<sup>2</sup>. Após a irradiação, as células foram contadas imediatamente em intervalos de tempo e apresentadas em cada gráfico até atingirem a fase estacionária de crescimento. Os ensaios foram preparados em placas de 24 poços, em triplicatas, e as células foram mantidas a 28°C durante o período do experimento.

### 3.2.2 Tratamento com cisplatina

No tratamento com cisplatina (cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), 1x10<sup>7</sup> parasitos/mL das linhagens CL Brener, DM28c, TcCSB<sup>+</sup>, TcCSB<sup>+/-</sup>, TcKap7<sup>KO</sup> e TcR51<sup>+/-</sup> em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 3000 rpm a 4 °C por 10 minutos, ressuspensos em 4 mL de PBS 1X estéril e distribuídos em tubos Falcon. Em seguida, foram tratados com cisplatina na concentração final de 300µM e incubados por 1 hora a 28 °C na estufa. Como controle, parasitos não tratados receberam um volume correspondente de dimetilformamida (DMF). Posteriormente, foram centrifugados a 3000 rpm a 4 °C por 15 minutos, lavados duas vezes em PBS 1X estéril e ressuspensos em LIT completo. Logo após, os parasitos tratados e não tratados foram distribuídos em placas de 24 poços, em triplicata técnica, 1 mL por poço, e incubados a 28 °C na estufa. Os parasitos foram, então, contados. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

### 3.2.3 Tratamento com doxorubicina

Os ensaios foram preparados em placas de 24 poços, em triplicatas. 1 x 10<sup>7</sup> células/mL de cada cultura foram coletadas e distribuídas nas placas de cultura, 1 mL em cada poço. Em cada poço, foi adicionada a quantidade apropriada de Dox, solubilizada em DMSO, e no controle foi adicionado apenas DMSO. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 28 °C. As células vivas foram contadas imediatamente após o tratamento e a cada 24 horas. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

### 3.2.4 Tratamento com Doxorubicina-alvo-mitocondria (Mt-Dox)

Os ensaios foram preparados em placas de 24 poços, em triplicatas. 1 x 10<sup>7</sup> células/mL de cada cultura foram coletadas e distribuídas nas placas de cultura, 1 mL em cada poço. Em cada poço, foi adicionada a quantidade apropriada de Mt-Dox, solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), e no controle foi adicionado apenas DMSO. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 28 °C. As células vivas foram contadas imediatamente após o tratamento e a cada 24 horas. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

### 3.3 Análise do número de lesões por *long range* qPCR

A técnica *long range* qPCR é utilizada para determinar a cinética de reparo do DNA nuclear e mitocondrial, foi adaptada pra *T. cruzi* baseada na padronização descrita por Santos e colaboradores (SANTOS; MEYER; MANDAVILLI; VAN HOUTEN, 2006). Nesse trabalho foi utilizada para quantificar a cinética de reparo para os tratamentos com UV-C e cisplatina, nas células CL Brener, TcCSB<sup>+</sup>, TcCSB<sup>+/-</sup> e para cisplatina com as células TcRad51<sup>+/-</sup>.

#### 4.3.1 Tratamento genotóxico para análise do número de lesões

O tratamento com radiação UV e cisplatina foi realizado seguindo o mesmo procedimento descrito nos itens 4.2.1 e 4.2.2. As células foram coletadas imediatamente após o tratamento e, para cada ponto do experimento (1 hora, 5 horas e 24 horas), 5 mL foram recolhidos e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Todas as células coletadas (*pellets*) por meio de centrifugação foram armazenadas a -80 °C para posterior extração do DNA.

#### 4.3.2 Extração de DNA

Os procedimentos de extração, quantificação, amplificação por qPCR e análise dos resultados foram conduzidos conforme descrito por Santos e colaboradores (SANTOS; MEYER; MANDAVILLI; VAN HOUTEN, 2006). O DNA genômico foi isolado utilizando o kit QIAGEN Genomic Tip Kit. Esse kit permite a purificação de longos fragmentos de DNA (de até 150 kb) sem o uso de fenol ou clorofórmio, possibilitando a subsequente amplificação de longos trechos de DNA. O protocolo empregado neste trabalho é baseado no protocolo de extração de tecido sugerido pelo fabricante, com algumas adaptações. Após as etapas de lavagem com etanol a 70%, as amostras de DNA foram dissolvidas em 100 µL de TE por pelo menos 2 dias a 4 °C.

#### 4.3.3 Dosagem das amostras de DNA

Após a extração de DNA, as concentrações das amostras foram corrigidas para 3 ng/µL. Para isso, foi realizada uma dosagem aproximada de cada amostra extraída utilizando o espectrofotômetro NanoDrop. Com a concentração aproximada de cada amostra em mãos, foi feita uma diluição das mesmas para a concentração de 3 ng/µL. Posteriormente, uma dosagem precisa dessas amostras diluídas foi realizada, construindo uma curva padrão usando o corante específico para dupla fita de DNA, PicoGreen (Invitrogen). A leitura da curva padrão foi obtida no fluorímetro de placa Synergy 2 (Biotek), por meio da leitura dos picos de fluorescência na

região do espectro entre 505 e 525 nm. As amostras diluídas foram corrigidas, sendo diluídas ou concentradas, de forma que a diferença de concentração entre a amostra mais concentrada e a menos concentrada fosse menor que 10%.

#### 4.3.4 Amplificação por qPCR

Os ensaios de quantificação de lesões foram realizados comparando a amplificação de um fragmento de DNA longo presente em uma amostra tratada com a amplificação de um controle não tratado. Uma reação "branco", sem DNA molde, também foi amplificada para descontar a presença de iniciadores e dNTP nas outras reações. Iniciadores específicos foram utilizados para amplificar fragmentos longos (aproximadamente 10 kb) e curtos (aproximadamente 250 pb) do genoma da mitocôndria e núcleo do *T. cruzi* conforme listados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 — Iniciadores usados no ensaio de qPCR

QPCRMitF	5' TTTTATTTGGGGGAGAACGGAGCG 3'
QPCRMitR	5' TTGAAACTGCTTTCCCAAACGCC 3'
QPCRMitInt	5' CGCTCTGCCCCCATAAAAAACCTT 3'
QPCRNucF	GCACACGGCTGCGAGTGACCATTCAACTTT
QPCRNucR	CCTCGCACATTTCTACCTTCAATGCCTGC
QPCRNucInt	TCGAGCAAGCTGACACTCGATGCAACCAAAG

Fonte: De autoria própria.

A amplificação do fragmento mitocondrial longo foi realizada com o par de iniciadores QPCRMitF e QPCRMitR. Dado que a probabilidade de ocorrência de danos em uma região pequena de DNA é muito baixa, os fragmentos curtos (250 pb) foram utilizados para normalizar os resultados das amplificações obtidos com os fragmentos longos (10 kb). Isso foi feito para eliminar qualquer viés resultante de alterações nas proporções mitocondriais do parasita. O fragmento mitocondrial curto foi amplificado com o par de iniciadores QPCRMitInt e

QPCRMitR. Com base na mesma explicação, para a amplificação do fragmento longo nuclear, o par de iniciadores QPCRNUCF e QPCRNUCR foi usado, enquanto o fragmento curto foi amplificado com QPCRNUCF e QPCRNUINT.

Todas as reações de amplificação foram conduzidas utilizando o *Kit Kappa Long Range Hot start PCR*, seguindo as concentrações indicadas pelo fabricante. As amplificações dos fragmentos de DNA foram realizadas em termocicladores, utilizando um número de ciclos que encerrasse a reação ainda no meio da fase exponencial da amplificação. As reações de qPCR foram executadas de acordo com os programas descritos na Tabela 2. As amostras amplificadas foram quantificadas por fluorimetria, conforme descrito anteriormente.

Tabela 2 — Programas utilizados para amplificação dos fragmentos longos e curtos para a qPCR

<b>Etapas</b>	<b>Fragmentos longos (10 kb)</b>	<b>Fragmentos curtos (250 pb)</b>
Passo 1	94°C por 1 minuto e 30 segundos	94°C por 1 minuto e 30 segundos
Passo 2	94°C por 1 minuto	94°C por 1 minuto
Passo 3	60°C por 15 segundos	60°C por 15 segundos
Passo 4	68°C por 12 minutos	68°C por 45 segundos
Passo 5	22 ciclos entre os Passos 2-4 (Núcleo) 21 ciclos entre os Passos 2-4 (Mitocôndria)	19 ciclos entre os passos 3 e 5 (Núcleo) 18 ciclos entre os passos 3 e 5 (Mitocôndria)
Passo 6	72°C por 10 minutos	72°C por 10 minutos
Passo 7	6°C indefinidamente	6°C indefinidamente

Fonte: De autoria própria.

#### 4.3.5 Análise dos resultados

A análise do número de lesões foi realizada comparando a amplificação dos fragmentos longos das amostras tratadas em relação à amplificação do controle não tratado. Para tal, além de descontar o valor de amplificação da reação “branco” dos valores obtidos em todas outras amplificações, foi feita a normalização usando os fragmentos curtos. Dessa forma, foi obtido o valor de amplificação relativa (amplificação tratado/amplificação não tratado). O número de

lesões por 10 kb foi obtido aplicando a fórmula  $-Ln \left[ \frac{\left( \frac{\text{Amplificação longa tratada}}{\text{Amplificação curta Tratada}} \right)}{\left( \frac{\text{Amplificação longa Não tratada}}{\text{Amplificação curta não Tratada}} \right)} \right]$ , uma vez

que o aparecimento de lesões no DNA segue uma distribuição de Poisson. Os valores

apresentados para cada amostra são a média dos valores obtidos através de duas reações de qPCR de dois experimentos biológicos diferentes.

### 3.4 PCR em tempo real

O experimento de PCR em tempo real foi conduzido para avaliar os transcritos mitocondriais em duas condições: condição normal e tratamento com 300  $\mu\text{M}$  de cisplatina e seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.2. Para isso, o RNA total de pelo menos  $1 \times 10^7$  células foi isolado, combinando os protocolos do reagente TRIzol™ (*Thermo Fisher Scientific*) e da purificação com colunas de sílica. Após a confirmação da integridade das amostras de RNA por eletroforese, elas foram tratadas com o TURBO DNA-free™ Kit (*Thermo Fisher Scientific*) e quantificadas por fluorimetria utilizando o Qubit™ RNA BR Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*). Em seguida, 2  $\mu\text{g}$  de RNA total foram convertidos em cDNA com o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). As eficiências dos ensaios de PCR foram calculadas, e apenas aqueles com eficiências no intervalo de 90 a 110% foram utilizados nos experimentos posteriores.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume total de 10  $\mu\text{l}$ , utilizando o Master mix qPCR Green Master HighROX with UNG 2X (Cellco Biotec), o sistema CFX96™ Real-Time System (Biorad), e placas de PCR de 96 poços UltraCruz® (Santa Cruz Biotechnology). Os valores de *fold-change* dos genes de interesse foram calculados pelo método do  $2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados produzidos foram analisados com o software GraphPad Prism versão 9.4.0, utilizando-se o teste t não pareado ou o teste *One-way* ANOVA corrigido pelo método de Tukey. Os primers utilizados estão na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 — Iniciadores usados no ensaio de *real time*

Alvo	Sequência
RPL9F	ACCGTTGTGAAGGACGAACT
RPL9R	TTCACCAGGCAGAGCTGATG
GAPDHF	CGGTGGACGGTGTGTCCGGTG
GAPDHR	CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG
COIIF	GGTGGGTGATATGCGTCTATTGCAG

COIIR	CAC CTA CCC GGT TCT CTA CCT TTA TAC CTA
ATP6eF	GAATTTTTAGCAAAGGGGAAAA
ATP6eR	AAAATGGGAAAATGCTTTCAA
ATP6mF	GCGGGCAACAACGGTTTTGAAA
ATP6mR	TAAGCTTGGCAAAAACGCCTCCT
ND7F	ATG GGA GCG GAT TTT CGA ACG AG
ND7R	CAA GCT AGA TTC CGG GTC CCT

Fonte: De autoria própria.

### 3.5 Microscopia de Fluorescência

Para a detecção da localização da Dox e mt-Dox, cultivamos parasitas epimastigotas em crescimento exponencial da linhagem CL Brener, que foram tratados conforme a metodologia com Dox e mt-Dox. Após 30 minutos, as amostras foram colhidas por centrifugação (2000g, 5 min), lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) e fixadas com paraformaldeído a 4%, diluído em 1x PBS, durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células então foram depositadas e espalhadas em lâminas pré-tratadas com 0,1% de poli-L-lisina e deixadas em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas contendo as células foram lavadas repetidamente (dez vezes) com 1x PBS. O meio de montagem ProLong® Diamond foi utilizado como uma solução de montagem anti-desbotamento e para corar organelas contendo DNA, como o núcleo e o cinetoplasto. Para esses experimentos, as imagens foram capturadas utilizando um microscópio de fluorescência no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) e foram analisadas utilizando o software Zen Software 2.6 (Blue Edition).

### 3.6 Pré-tratamento com inibidores das cinases ATM e ATR

Parasitas TcCSB<sup>+/-</sup> em fase exponencial de crescimento na concentração de 1x10<sup>7</sup> parasitos/mL foram centrifugados a 3000 rpm à 4°C por 10 minutos e, em seguida, ressuspensos em PBS 1X estéril. Logo após, foram tratados com 2, 5 e 10 mM de cafeína (inibidor inespecífico de ATM/ATR). Como controle, o grupo não-tratado foi incubado com DMF. As células TcCSB<sup>+/-</sup> aproximadamente 1h antes do término do período de incubação com

os inibidores, os parasitos foram tratados com mt-Dox e incubados novamente na estufa à 28°C até o fim do tratamento. Após o término do período de incubação, os parasitos tratados e não-tratados foram contados. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS 1X estéril e ressuspendidos em meio LIT completo. Por fim, foram distribuídos em placas de 24 poços revestida em plástico filme, em triplicata técnica, 1 mL por poço, e incubados à 28°C na estufa. A contagem dos parasitos vivos foi contada em câmara de Neubauer com corante vital eritosina.

### **3.7 Análise estatísticas**

Para as curvas de crescimento e sobrevivência de *T. cruzi*, assim como para os experimentos de qPCR, foi utilizado o teste t não pareado. Todas as análises estatísticas neste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Os dados foram apresentados como a média +/- desvio padrão (SD).

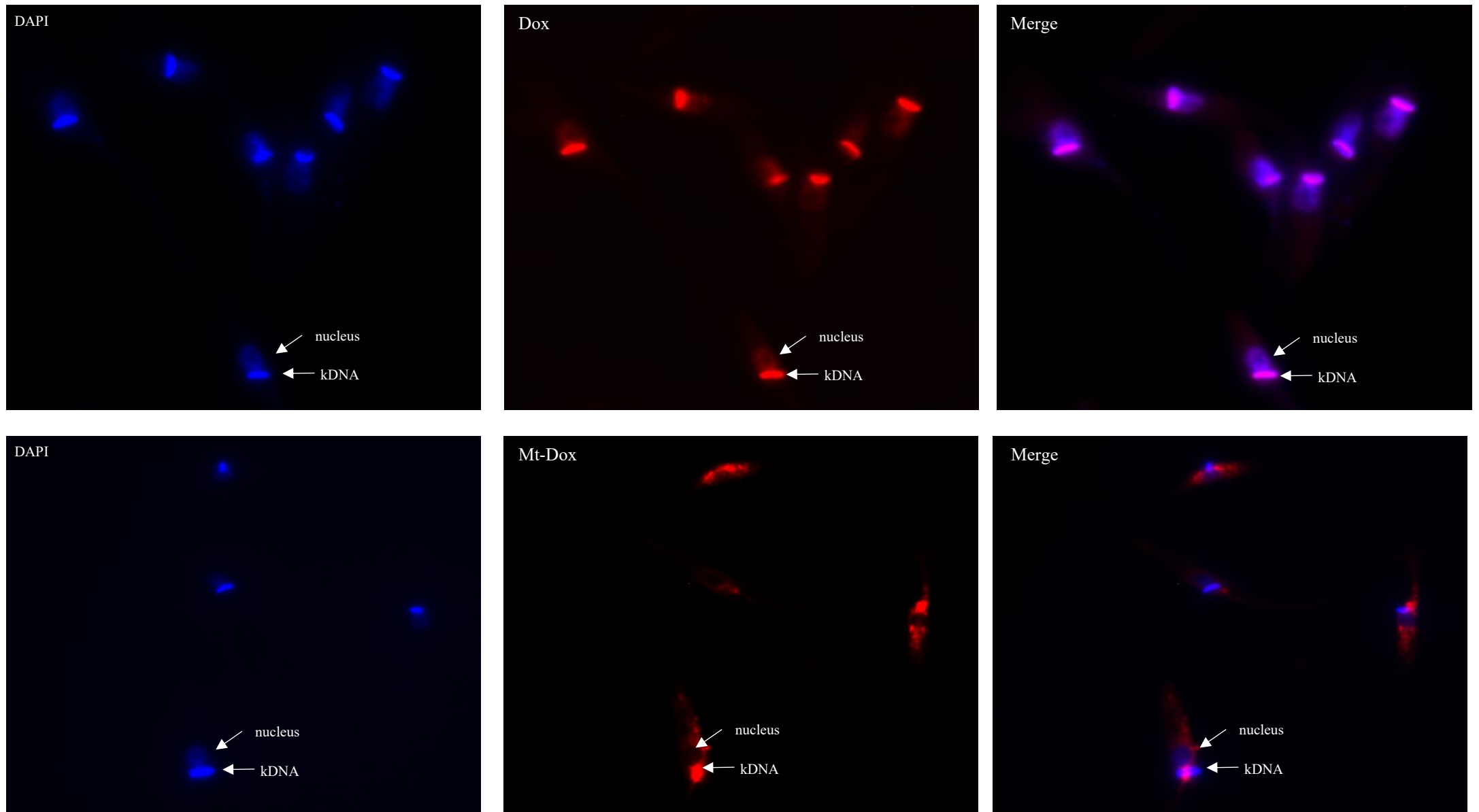
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaio de localização da Dox e mt-Dox

O *T. cruzi* é um organismo que apresenta diferenças importantes em relação às células de outros eucariotos, como as células humanas. Nestas últimas, sabe-se que a Dox é direcionada para o núcleo e a mt-Dox para a mitocôndria (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013). Nesse sentido, para confirmar se isso também ocorre em *T. cruzi*, verificamos a localização dessas drogas e, principalmente, se o peptídeo de captação mitocondrial estava sendo direcionado, de fato, para a mitocôndria desse organismo. Pelo fato da Dox ser um composto com fluorescência, podendo ser excitado a 490 nm e gerar uma emissão a 590 nm, isso nos permite verificar a sua localização por meio de microscópio de fluorescência (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013). Além disso, esse agente genotóxico tem como particularidade a capacidade de intercalar ao DNA, tornando possível identificar se esse composto se encontra no kDNA ou no DNA nuclear do *T. cruzi*.

Dessa forma, as células da cepa CL Brener foram tratadas com Dox e mt-Dox e submetidas à fixação em lâminas. Como resultado, foi possível observar a marcação do DNA nuclear e mitocondrial com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em azul (Figura 16). Ao avaliar a fluorescência do Dox, obtivemos sobreposição de sua fluorescência com o DNA nuclear quanto no kDNA, como apresentado na Figura 16. Ao examinar a fluorescência do mt-Dox, observamos que não houve marcação de sua fluorescência no núcleo dessas células. Em vez disso, houve fluorescência sobreposta com o kDNA e ao longo do corpo do parasita, comprovando, assim, que esse peptídeo de captação mitocondrial está direcionando corretamente o agente genotóxico para a mitocôndria do *T. cruzi*, semelhante ao observado em células humanas (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016).

Figura 16 — Imagens de fluorescência de *T. cruzi* tratados com DOX e Mt-Dox



Legenda: Imagens de fluorescência de *T. cruzi* tratados com 16 μM de mt-DOX e Dox, em vermelho. Setas amarelas indicam a posição do núcleo Dox e Mt-Dox. O DNA genômico e o kDNA foram marcados com 10 μM de DAPI, em azul. Barra de escala = 100 μm.

Fonte: De autoria própria.

## 4.2 Resultados reparo por recombinação homóloga

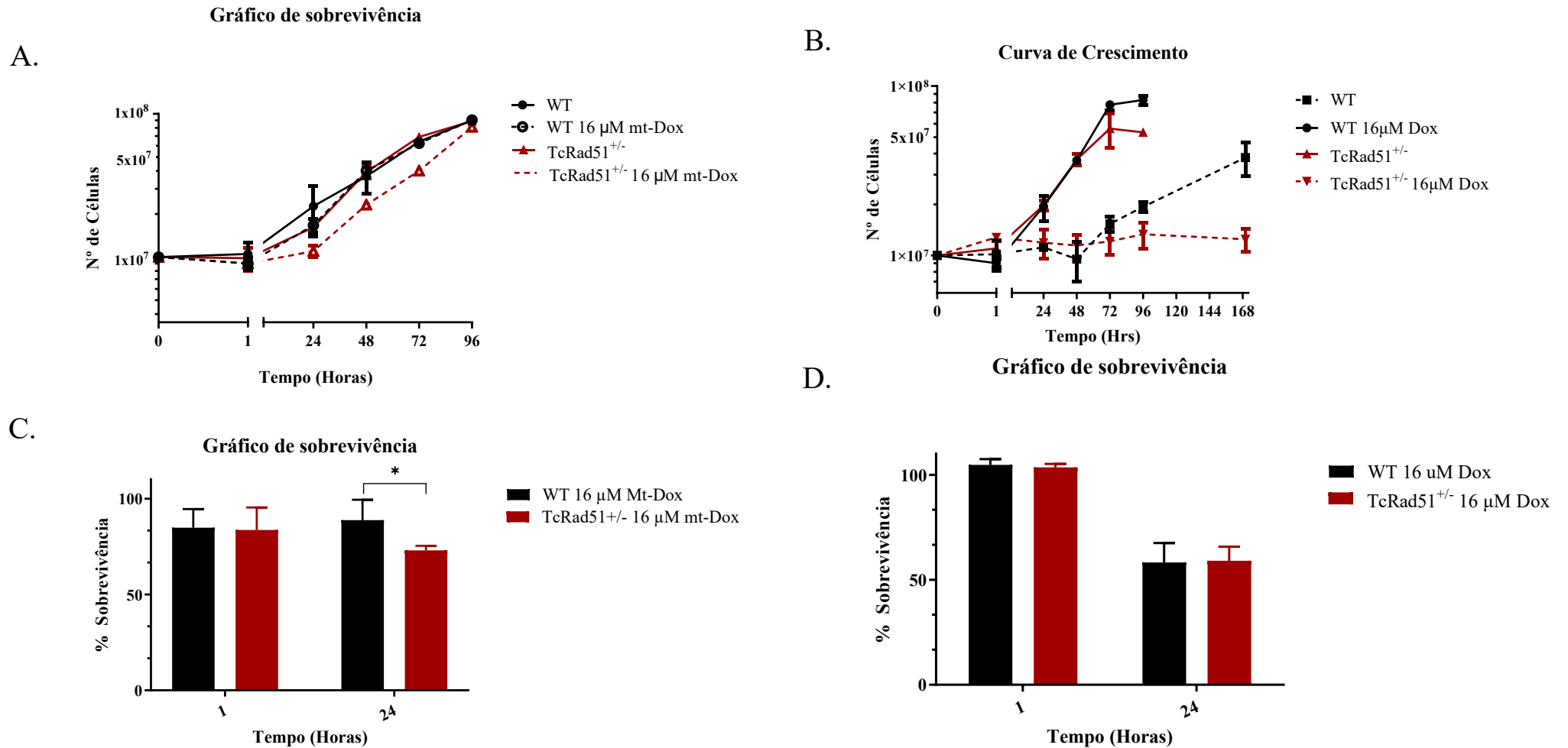
Durante o reparo por recombinação homóloga, a proteína Rad51 desempenha um papel crucial. Auxiliada pelas enzimas BRCA2 e PALB2, responsável por iniciar o processo de invasão da dupla fita de DNA na fita homóloga adjacente, formando um D-loop necessário para a fase inicial do reparo por recombinação homóloga (FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006; HOLLOMAN, 2011). Como discutido anteriormente, a Rad51 também desempenha um papel central na resposta à DSB e na troca de material genético no *T. cruzi* (ALVES; REPOLES; DA SILVA; MENDES *et al.*, 2018; PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010; REGIS-DA-SILVA; FREITAS; PASSOS-SILVA; FURTADO *et al.*, 2006). Durante minha dissertação de mestrado, foram coletadas evidências do processo de recombinação mitocondrial com o envolvimento de Rad51 (FERREIRA, 2019). Assim, para investigar mais a fundo esse papel, os próximos resultados a seguir foram obtidos com o heminocaute de TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) desenvolvidos para ajudar a compreender melhor essa função dessa proteína no kDNA do *T. cruzi*.

### 4.2.1 Resultados TcRad51<sup>+/-</sup> com Dox e mt-Dox

Como já mencionado anteriormente, a doxorubicina (Dox) pertence à classe das antraciclinas e é descrita como um inibidor da topoisomerase II, sendo que seu análogo mitocondrial deve manter a mesma função. Essa inibição leva a uma falha nos mecanismos de replicação e transcrição e, caso não seja reparada, pode levar à formação de quebras na dupla fita de DNA (CARVALHO; SANTOS; CARDOSO; CORREIA *et al.*, 2009). Foi demonstrado que TcRad51<sup>+/-</sup> é sensível à mt-Dox, pois, após o tratamento com 16 µM dessa droga, houve um retardo do crescimento (Figura 17.A), que conseqüentemente levou à uma diminuição na sua sobrevivência em 24 horas, devido a sua parada no crescimento (Figura 17.C) (FERREIRA, 2019).

Para continuar essa investigação, decidimos analisar as diferenças nas respostas nuclear e mitocondrial frente a lesões ocasionadas pela doxorubicina. Para isso, utilizamos esse agente genotóxico sem o peptídeo de captação mitocondrial. Após tratamento com 16 uM de doxorubicina (Figura 17.B), apresentou que tanto as células selvagens da cepa CL Brener (WT) quanto os heminocautes para TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) pararam o seu crescimento. As células WT conseguiram retornar o seu crescimento em 72 horas após o tratamento, enquanto as células TcRad51<sup>+/-</sup> não conseguiram mais retornar o crescimento, ou seja, a deficiência desse gene alterou a resposta das células contra a droga. Contudo, não observamos diferenças em sua taxa de sobrevivência em relação à cepa selvagem em 1 hora e 24 horas (Figura 17.D).

Figura 17 - Resposta a lesões causadas por Dox e mt-Dox em células WT e heminocaute de TcRAD51<sup>+/-</sup>



Legenda: Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por Mt-Dox e Dox em células epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (WT) em preto, heminocautes de TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) em vermelho. (\* $P < 0.05$ , teste *t* student).

A) Curva de crescimento de WT e TcRad51<sup>+/-</sup> após exposição à 16 $\mu$ M de mt-Dox nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. Mostra sensibilidade de TcRad51<sup>+/-</sup> 24 horas após o tratamento

B) Curva de crescimento após exposição à 16 $\mu$ M de DOX nas células WT e TcRad51<sup>+/-</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h, 96h e 168h. Apresenta parada no crescimento nas células TcRad51<sup>+/-</sup>.

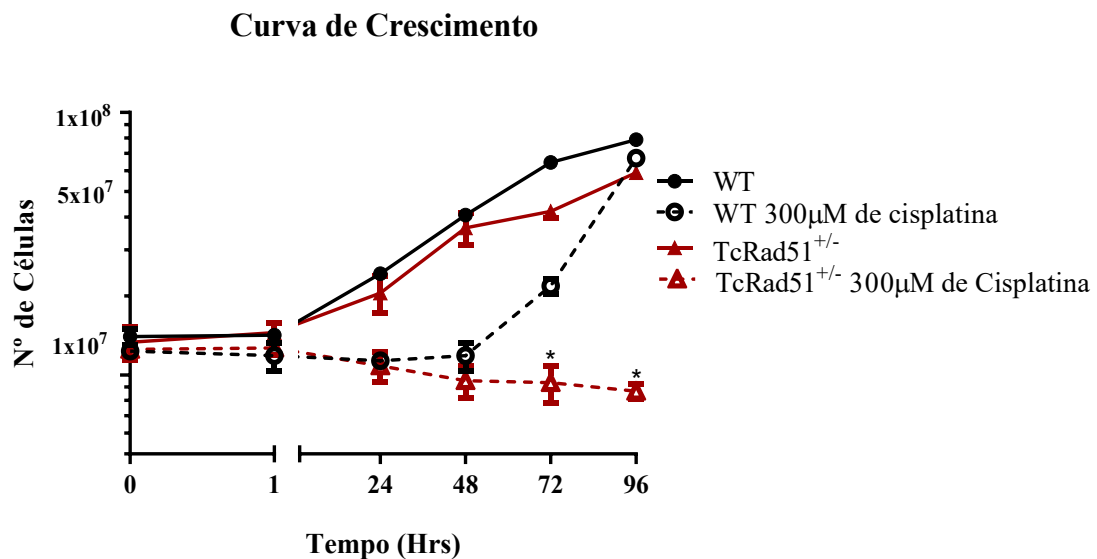
C) Gráfico de sobrevivência após exposição à 16 $\mu$ M de mt-Dox nas células WT e TcRad51<sup>+/-</sup> nos tempos 1h e 24h após tratamento, mostram sensibilidade nas células TcRad51<sup>+/-</sup> 24 horas após o tratamento.

D) Gráfico de sobrevivência após exposição à 16 $\mu$ M de Dox nas células WT e TcRad51<sup>+/-</sup> nos tempos 1h e 24h após tratamento, não apresenta diferenças estatística entre as cepas avaliadas.

#### 4.2.2 Resultados TcRad51<sup>+/-</sup> tratada com cisplatina

Apesar de os adultos DNA-cisplatina serem reparados primariamente pelo reparo por excisão de nucleotídeos (WANG; LIPPARD, 2005), esse agente genotóxico também pode levar à formação de *crosslink* entre fitas que envolvem várias vias de reparo inclusive à recombinação homóloga, assim como de forma indireta leva a formação de DSBs (HUANG; LI, 2013). Visando investigar o papel de TcRad51 nessas lesões, as células heminocaute de TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) e células WT foram tratadas com 300μM de cisplatina (Figura 18). O gráfico mostra que as células TcRad51<sup>+/-</sup> e WT interrompem o seu crescimento até 24 horas. Enquanto as células WT retomam o seu crescimento celular de 24 a 48 horas, as células TcRad51<sup>+/-</sup> apresentam uma sensibilidade a partir de 48 horas, tendo inclusive verificado uma morte celular.

Figura 18 — Resposta a lesões causadas por cisplatina em células WT e TcRAD51<sup>+/-</sup>



Legenda: Resposta a lesões causadas por 300μM de cisplatina em células selvagens (WT) em preto e heminocaute de TcRAD51 (TcRAD51<sup>+/-</sup>) em vermelho de *T. cruzi*. Curva de crescimento de após exposição, nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h, 96h. Células TcRad51<sup>+/-</sup> são mais sensíveis ao tratamento. (\*P<0.05, teste *t* student).

Fonte: De autoria própria.

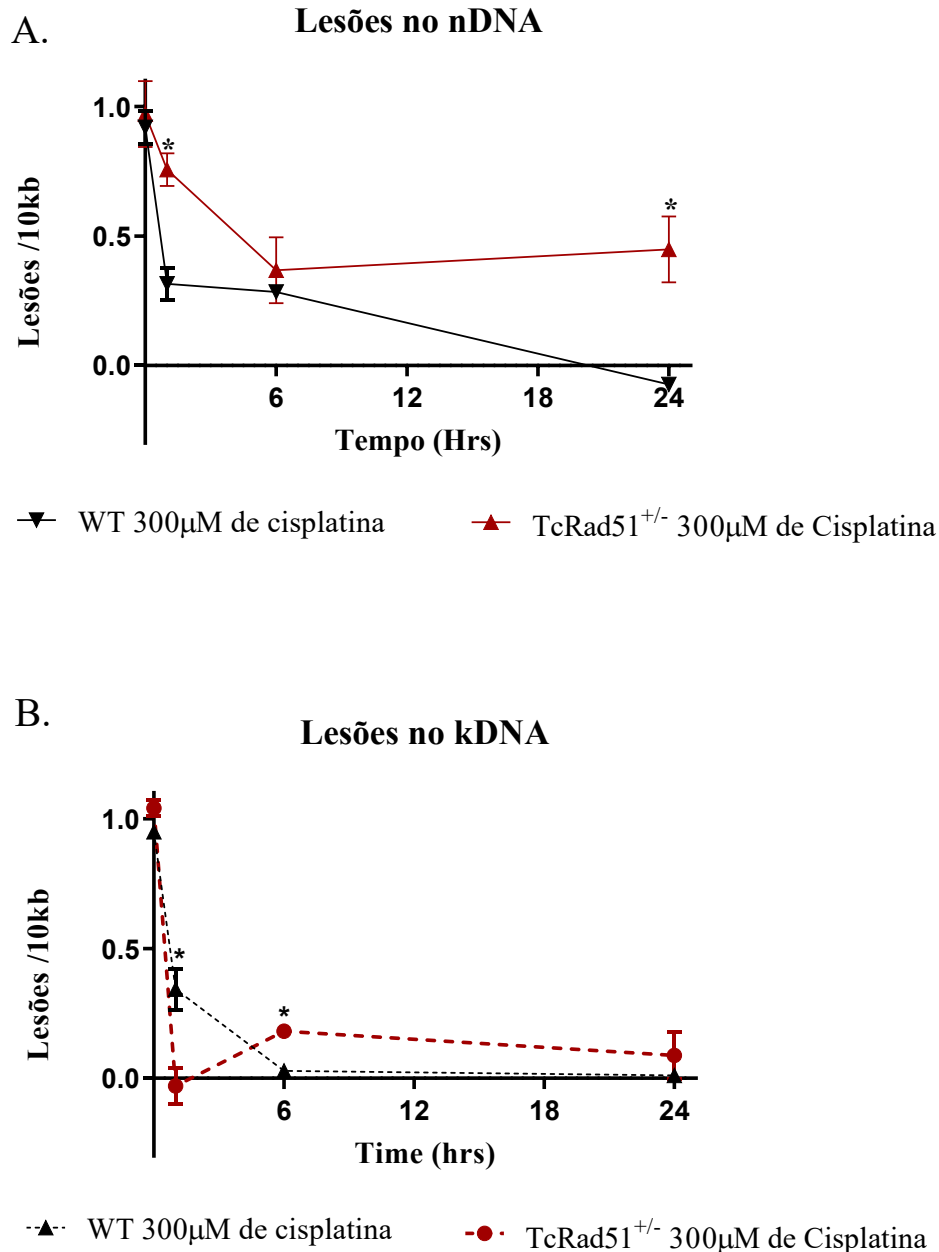
#### 4.2.3 Cinética de reparo de DNA lesionado com cisplatinas células TcRad51<sup>+/-</sup>

Visto que as células heminocaute de TcRad51 pararam o seu crescimento, decidimos, então, realizar uma quantificação de danos para verificar se essa parada no crescimento estava relacionada a lesões em seu genoma nuclear e mitocondrial. Para isso, tratamos essas células

CL Brener (WT) e heminocaute de TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) com 300 $\mu$ M de cisplatina e posteriormente, foi realizada a técnica de qPCR de quantificação de lesões para o núcleo e mitocôndria.

Após o tratamento, foi feita a quantificação de danos ao DNA nuclear (Figura 19.A), em que verificamos que o WT apresenta uma queda de lesões na primeira hora e uma queda mais lenta entre 6 a 24 horas. Esses resultados são condizentes com dados anteriores obtidos para esse tratamento (RAJAO, 2011; REPOLÊS, 2019). No entanto, nas células TcRad51<sup>+/-</sup>, houve uma alteração no reparo até 1 á 6 horas, onde foi possível observar que as lesões caíram mais lentamente em comparação ao WT até 6 horas após o tratamento, e não havendo o reparo de 6 a 24 horas. Esses resultados demonstram como a deficiência de TcRad51 altera consideravelmente o segundo momento do reparo nuclear no *T. cruzi*.

Os resultados obtidos pela quantificação de danos ao DNA mitocondrial (Figura 19.B) mostram que a cepa selvagem apresenta em sua cinética de reparo, uma queda de lesões na primeira hora e uma segunda queda até 6 horas com a retirada de todas as lesões. Esses resultados são condizentes com dados anteriores obtidos para esse tratamento (RAJAO, 2011; REPOLÊS, 2019). Quando avaliamos as células TcRad51<sup>+/-</sup>, observamos, curiosamente, uma melhora no desaparecimento de lesões no primeiro momento de reparo, seguido de um aumento de lesões até 6 horas após o tratamento, que se mantém até 24 horas. Esses resultados demonstram como a deficiência de TcRad51 altera todas as etapas do reparo de DNA, sendo que, a ausência do gene melhora o reparo rápido que ocorre no primeiro momento e não permite o reparo que é realizado entre 6 e 24 horas.

Figura 19 — Cinética de reparo de lesões causadas por cisplatina em células WT e TcRad51<sup>+/-</sup>

Legenda:

Cinética do reparo de lesões causadas por 300µM de cisplatina no núcleo e mitocôndria de células selvagem (Wt) e células Hemi-nocaute para TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) as medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, 6 horas e 24 horas após o tratamento;

**A.** Cinética de reparo nuclear, linhas contínuas Wt em preto e TcRad51<sup>+/-</sup> em vermelho. Células (TcRad51<sup>+/-</sup>) tem sua cinética de reparo nuclear alterada em comparação ao WT nos tempos, 1 Hr, 6hrs e 24 Hrs;

**B.** Cinética de reparo mitocondrial, linhas contínuas Wt em preto e TcRad51<sup>+/-</sup> em vermelho. TcRad51<sup>+/-</sup> tem sua cinética de reparo mitocondrial alterada positivamente em comparação ao WT nos tempos, 1 Hr, e alteração negativamente no tempo de 6hrs. (\* P<0,05, teste t student).

Fonte: De autoria própria.

#### 4.2.4 Resposta TcTopo3 $\alpha$ <sup>ko</sup> e Topo3 $\beta$ <sup>KO</sup> a Dox e mt-Dox

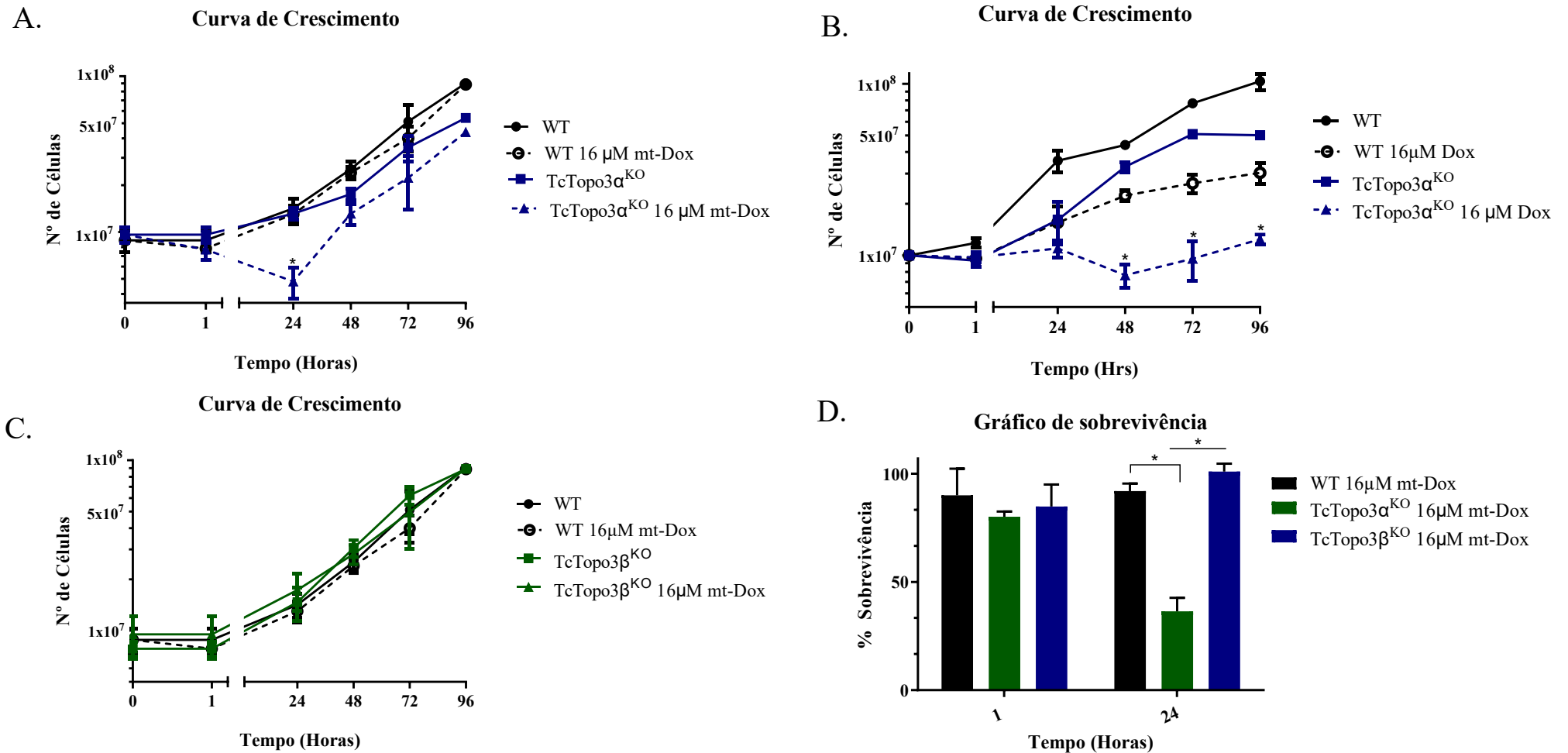
Durante o final do reparo por recombinação homóloga, forma-se uma estrutura complexa chamada de junção de *holliday*, sendo ela processada coletivamente pelo complexo BLM-TOPOIII-RMI1-RMI2, pela endonuclease GEN1, pelo complexo MUS81-EME1 e SLX1-SLX4 (CICCIA; ELLEDGE, 2010; FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que em *T. cruzi* a enzima TcTopo3 $\alpha$  também desempenha um papel crucial no manejo de lesões na dupla fita de DNA causadas pelos agentes genotóxicos MMS, radiação gama e hidroxireia (COSTA-SILVA; RESENDE; UMAKI; PRADO *et al.*, 2021). Alguns estudos têm mostrado um papel importante da DNA topoisomerase 3 $\alpha$  nas mitocôndrias, e além da possibilidade do seu envolvimento no reparo, foi demonstrado ser responsável pela manutenção da integridade do DNA mitocondrial (COSTA-SILVA; RESENDE; UMAKI; PRADO *et al.*, 2021; NICHOLLS; NADALUTTI; MOTORI; SOMMERVILLE *et al.*, 2018; TSAI; LIN; HSIEH, 2016). Com isso, decidimos investigar seu envolvimento em lesões mitocondriais, obtendo os seguintes resultados.

As células DM28c (WT), topoisomerase 3 $\alpha$  (TcTopo3 $\alpha$ <sup>KO</sup>) e topoisomerase 3 $\beta$  (TcTopo3 $\beta$ <sup>KO</sup>) foram tratadas com a mt-Dox. As células WT não apresentaram sensibilidade, e não foi observada alteração em sua taxa de crescimento em nenhum tempo observado (Figura 20). As células TcTopo3 $\alpha$ <sup>KO</sup> demonstraram uma sensibilidade 1 hora após o tratamento, que foi aumentando até 24 horas (Figura 20.A), nesse tempo, apresentou uma taxa de sobrevivência aproximada de 40% (Figura 20.D). Para verificar se esse fenotipo estava relacionado ao reparo ou era uma consequência do nocaute de uma topoisomerase, avaliamos a resposta desse agente genotóxico nas células TcTopo3 $\beta$ <sup>KO</sup>. Essa topoisomerase é descrita na regulação da formação de R-loops durante a transcrição e se associa a mRNAs regulando sua tradução, trabalhando com outras proteínas ligadoras de RNA (RBPs) (AHMAD; SHEN; LI; XUE *et al.*, 2017; POMMIER; SUN; HUANG; NITISS, 2016). No entanto, não foi observado nenhuma diferença em comparação as células WT, no crescimento (Figura 20.C), assim como na sobrevivência (Figura 20.D), demonstrando assim que essa topoisomerase não parece estar associada ao reparo de DNA de lesões geradas por MT-Dox.

Como foi realizado para TcRad51<sup>+/-</sup>, também realizamos o tratamento com Dox, para observar se também teríamos um resposta diferente quando o genoma nuclear é o alvo. As células WT, não pararam o seu crescimento (Figura 20.B), mas apresentaram um atraso em comparação com as células não tratadas. Contudo as células TcTopo3 $\alpha$ <sup>KO</sup> não conseguiram retornar o seu crescimento (Figura 20.B), obtendo uma resposta muito semelhante à obtida

anteriormente com o heminocaute de TcRad51, evidenciando que esse agente genotóxico parou o crescimento em células deficientes em TcTopo3 $\alpha$ , como ocorreu nas células deficientes de TcRad51. Esses resultados, em conjunto, corroboram o fato de que, para o *T. cruzi*, o reparo por recombinação homóloga nuclear é de vital importância, possivelmente devido à ausência da via do NHEJ (PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010; REGIS-DA-SILVA; FREITAS; PASSOS-SILVA; FURTADO *et al.*, 2006).

Figura 20 — Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por Dox e mt-Dox em células WT, TcTopo3 $\alpha^{KO}$  e TcTopo3 $\beta^{KO}$



Legenda: Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por Mt-Dox e Dox em células epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (WT) em preto, nocautes de TcTopo3 $\alpha$  (TcTopo3 $\alpha^{-/-}$ ) em azul e TcTopo3 $\beta$  (TcTopo3 $\beta^{-/-}$ ) em verde .

A) Curva de crescimento de WT e TcTopo3 $\alpha^{-/-}$  após exposição à 16 $\mu$ M de mt-Dox nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. Mostra sensibilidade de TcTopo3 $\alpha^{-/-}$  24 horas após o tratamento

B) Curva de crescimento após exposição à 16 $\mu$ M de DOX nas células WT e TcTopo3 $\alpha^{-/-}$  nos tempos 1h, 24h, 48h e 72h. Apresenta parada no crescimento nas células TcTopo3 $\alpha^{-/-}$ .

C) Curva de crescimento de células TcTopo3 $\beta^{-/-}$  e WT após exposição à 16 $\mu$ M de mt-DOX nos tempos 1h, 24h, 48h e 72h. não apresenta diferenças D) Gráfico de sobrevivência após exposição à 16 $\mu$ M de mt-Dox nas células WT, nocautes de TcTopo3 $\beta$  e TcTopo3 $\alpha$ , nos tempos de 1h e 24h após tratamento (\* $P < 0.05$ , teste *t* student).

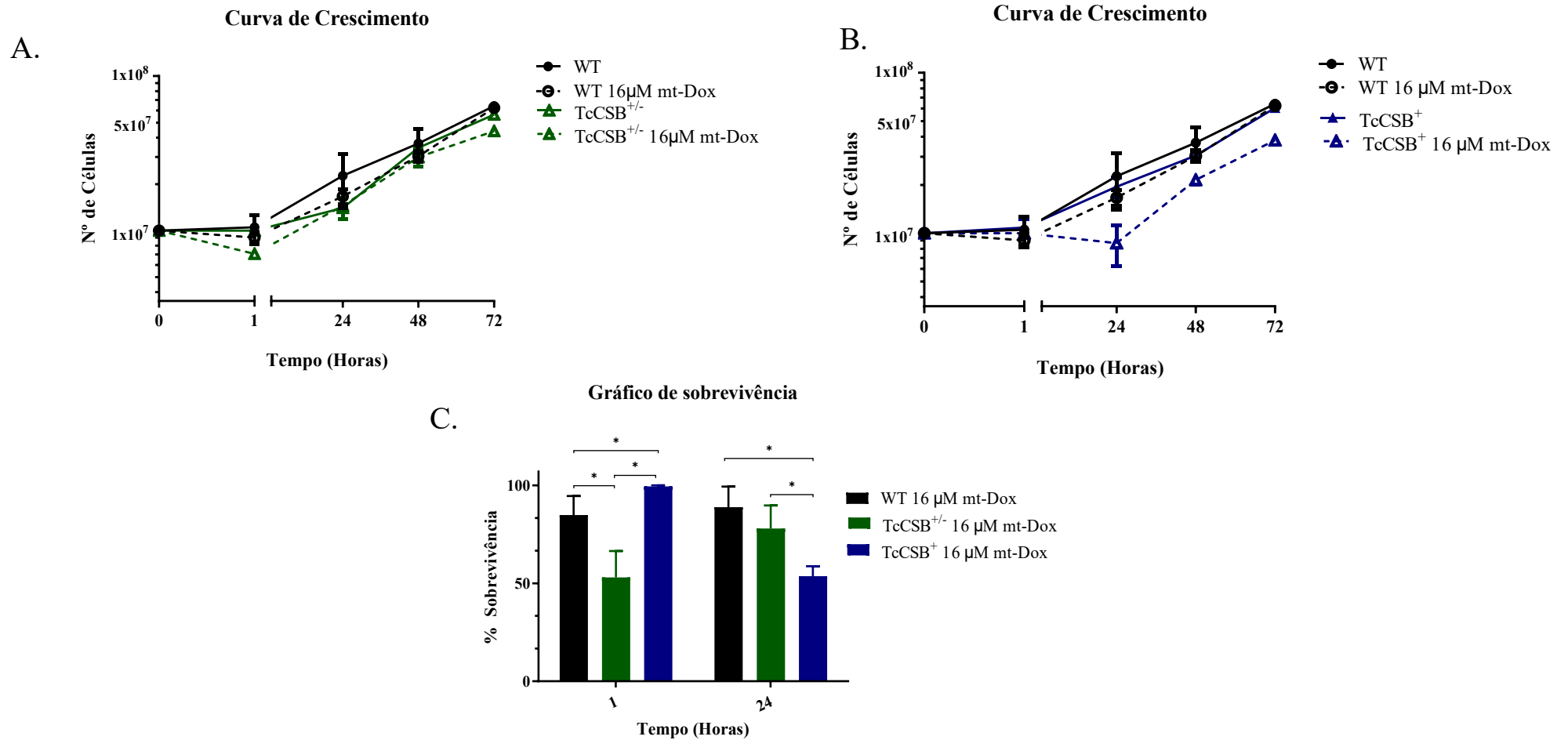
### 4.3 Resultados reparo acoplado ao processo de transcrição

Avaliando as lesões mitocondriais geradas por cisplatina nas células TcRad51<sup>+/-</sup>, mostrou-se que a depleção de TcRad51 inicialmente favoreceu um processo de reparo rápido, mostrando inclusive que o *T. cruzi* estava reparando eficiente lesões geradas por cisplatina na mitocôndria. Alguns estudos sobre o efeito da cisplatina nas mitocôndrias indicaram que esse agente genotóxico bloqueia a transcrição e replicação do mtDNA, marcando-as para degradação seletiva (LARSEN; RASMUSSEN; RASMUSSEN, 2005). O que não poderia acontecer devido à natureza de sua mitocôndria única, como essa organela tem um processo transcricional bem complexo, parada nesse processo poderia ser muito prejudicial ao *T. cruzi*. Em busca de investigar mais evidências de um reparo acoplado ao processo transcricional, realizamos experimentos em células heminocaute (TcCSB<sup>+/-</sup>) e superexpressoras de TcCSB (TcCSB<sup>+</sup>) porque, como já mencionado, é uma proteína de reparo essencial na ativação da via TC-NER. Essa proteína é responsável em reconhecer a RNA polimerase parada e retirá-la do local da lesão, e, conseqüentemente, ativando o processo de reparo. Como a doxorubicina também interrompe o processo de transcrição (KCIUK; GIELECINSKA; MUJWAR; KOLAT *et al.*, 2023), o direcionador presente na mt-Dox permitiria observar o efeito da parada da RNA polimerase durante a transcrição exclusivamente do kDNA.

#### 4.3.1 Resposta das células TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup> a Dox e mt-Dox

As células selvagens, heminocautes e superexpressoras de TcCSB foram submetidas a 16 µM de mt-Dox (Figura 21). Os resultados obtidos com mt-Dox mostraram que as células heminocautes de CSB (TcCSB<sup>+/-</sup>) (Figura 21.A) foram mais sensíveis na primeira hora após o tratamento. Após esse momento, as células foram capazes de crescer em nível similar às células selvagens. As células superexpressoras (TcCSB<sup>+</sup>), porém, foram mais resistentes 1 hora após o tratamento (Figura 21.B), mas não foram capazes de crescer até 24 horas. Para esses mutantes, a retomada de crescimento foi observada somente após 24 horas do tratamento. Portanto, quando focamos em 1 hora após o tratamento, é possível verificar que as células heminocautes de TcCSB são mais sensíveis, enquanto as células superexpressoras de TcCSB são mais resistentes (Figura 21.C). Quando avaliamos 24 horas após o tratamento é possível verificar uma menor taxa de sobrevivência de aproximadamente 60% nas células TcCSB<sup>+</sup>, enquanto as células WT e TcCSB<sup>+/-</sup> estão próxima de 100%. Esse resultado é observado devido a parada no crescimento das células TcCSB<sup>+</sup>. Contudo, quando usamos a doxorubicina sem o peptídeo (16 µM de Dox) (Figura 22), as células superexpressoras foram

mais sensíveis na primeira hora após o tratamento, mas foram capazes de voltar a crescer em 24 horas (Figura 22.B). Por outro lado, as células heminocautes foram mais resistentes 1 hora após o tratamento e foram capazes de retornar seu crescimento de modo semelhante às cepas selvagens (Figura 22.A). Após 1 hora de tratamento, é possível verificar, então, que as células superexpressoras de TcCSB são mais sensíveis tendo uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 70%, enquanto as células WT e TcCSB<sup>+/-</sup> apresentam uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 95% (Figura 22.C). Em 24 horas, nota-se uma recuperação melhor das células superexpressoras. Esses resultados mostraram que existe uma diferença na resposta entre núcleo e mitocôndria para lesões geradas por doxorubicina.

Figura 21 — Resposta a lesões causadas por mt-Dox em WT, TcCSB<sup>+/-</sup>, TcCSB<sup>+</sup>

## Legenda

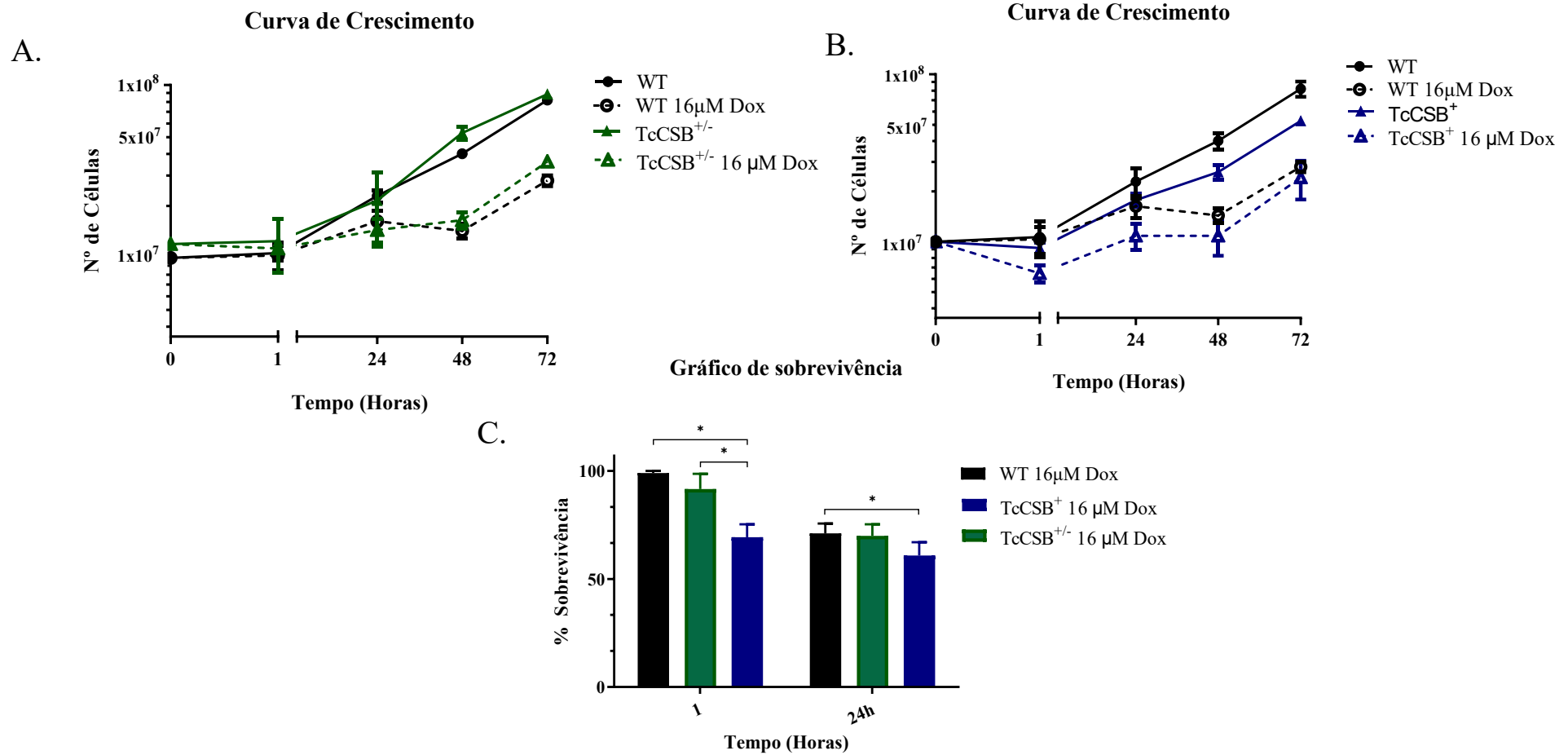
Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por Mt-Dox em células epimastigotas de *T.cruzi* selvagens (WT) em preto, heminocautes de TcCSB (TcCSB<sup>+/-</sup>) em verde e superexpressora de TcCSB (TcCSB<sup>+</sup>) em Azul.

**A)** Curva de crescimento de WT e TcCSB<sup>+/-</sup> após exposição à 16µM de mt-Dox nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h. Mostra sensibilidade de TcCSB<sup>+/-</sup> 1 hora após o tratamento;

**B)** Curva de crescimento após exposição à 16µM de mt-Dox nas células WT e TcCSB<sup>+</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h e 72h. Apresenta parada no crescimento nas células TcCSB<sup>+</sup> até 24 horas após o tratamento;

**C)** Gráfico de sobrevivência após exposição à 16µM de mt-Dox nas células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup>, nos tempos de 1h e 24h após tratamento, apresentam menor sobrevivência nas células TcCSB<sup>+/-</sup> 1 hora após o tratamento e menor sobrevivência nas células TcCSB<sup>+</sup> 24 horas após o tratamento (\*P<0.05, teste t student).

Figura 22 — Resposta a lesões causadas por Dox em células selvagens (WT), heminocautes de TcCSB (TcCSB +/-), e superexpressora de TcCSB (TcCSB+)



Legenda: Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por Dox em células epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (WT) em preto, heminocautes de TcCSB (TcCSB<sup>-/-</sup>) em verde e superexpressora de TcCSB (TcCSB<sup>+</sup>) em Azul

**A)** Curva de crescimento de WT e TcCSB<sup>-/-</sup> após exposição à 16µM de Dox nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h. Não apresenta diferenças entre as células WT e TcCSB<sup>-/-</sup>;

**B)** Curva de crescimento após exposição à 16µM de Dox nas células WT e TcCSB<sup>+</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h e 72h. Apresenta sensibilidade e parada no crescimento nas células TcCSB<sup>+</sup>;

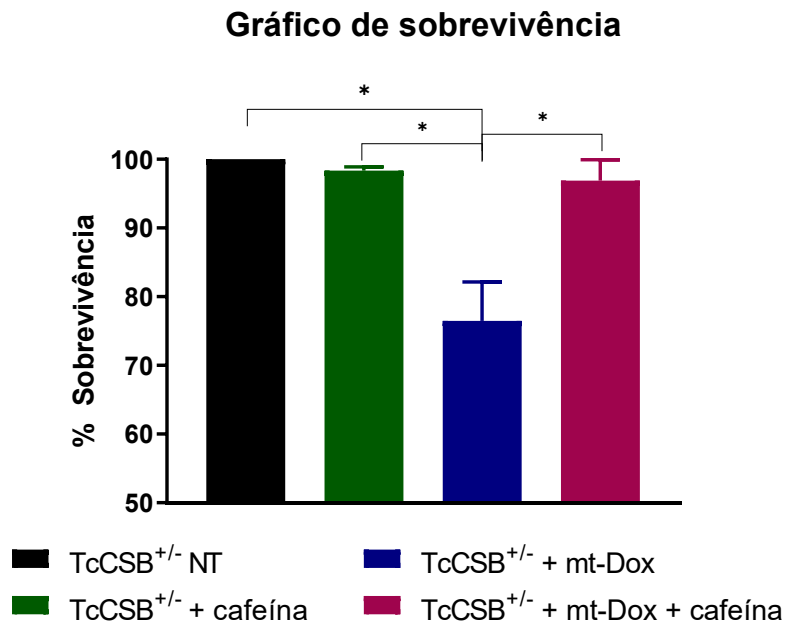
**C)** Gráfico de sobrevivência após exposição à 16µM de Dox nas células WT, TcCSB<sup>-/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup>, nos tempos de 1h e 24h após tratamento, apresentam menor sobrevivência nas células TcCSB<sup>+</sup> 1 e 24 horas após o tratamento (\***P<0.05, teste t student**).

Fonte: De autoria própria.

### 4.3.2 Sinalização por mt-Dox

Nos questionamos se a morte ocasionada por mt-Dox é sinalizada e se haveria um envolvimento das quinases ATM e ATR ou outra quinase. Como a sensibilidade foi observada nas células TcCSB<sup>+/-</sup>, decidimos realizar um experimento com cafeína (inibidor inespecífico de ATM e ATR). As células TcCSB<sup>+/-</sup> foram pré-tratadas com cafeína e posteriormente tratadas com mt-Dox. As células foram contadas 1 hora após o tratamento (Figura 23). Foi possível observar que as células tratadas com mt-Dox tiveram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 75% em azul. Quando foram pré-tratadas com cafeína, houve um resgate para aproximadamente 95%, e o tratamento apenas com cafeína resultou em uma taxa de sobrevivência de 98%. Esses dados indicam que a cafeína resgatou TcCSB do processo de morte induzida por mt-Dox.

Figura 23 — Gráfico de sobrevivência TcCSB<sup>+/-</sup> pré-tratados com cafeína e tratados com mt-Dox



Legenda: As células de *T. cruzi* foram pré-tratadas 1 hora com 2mM de Cafeína (inibidor inespecífico de ATM/ATR). No término do período de incubação foram tratadas com mt-Dox. Em preto células TcCSB<sup>+/-</sup> não tratadas. Em verde células TcCSB<sup>+/-</sup> tratadas apenas com cafeína, em azuis células TcCSB<sup>+/-</sup> tratadas apenas com mt-Dox e em vinho células TcCSB<sup>+/-</sup> pré-tratadas com cafeína e tratadas com mt-Dox. O Gráfico mostra que cafeína reverteu a morte ocasionada por mt-Dox.

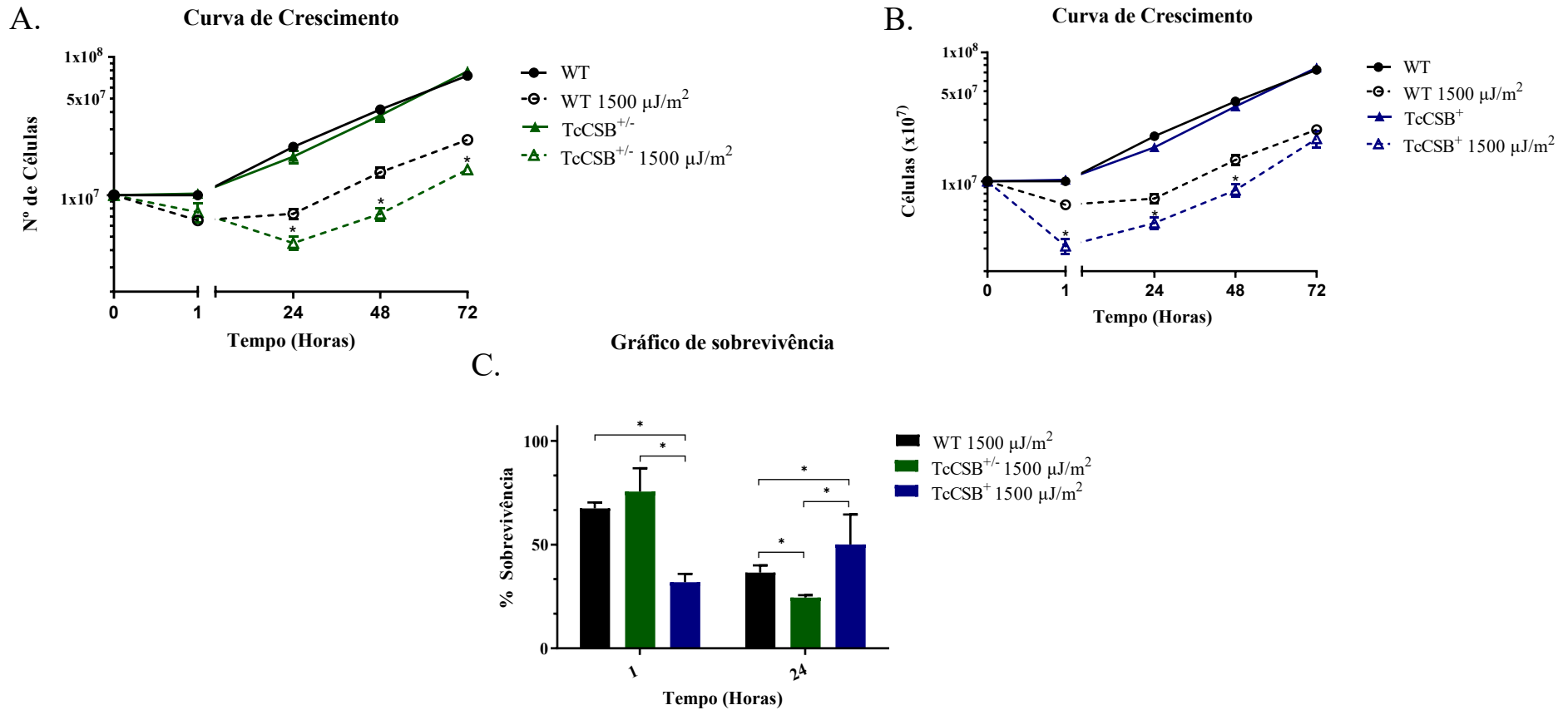
Fonte: De autoria própria.

### 4.3.3 Resposta do *T. cruzi* a Radiação UV

Outra fonte conhecida de danos, caracterizada como capaz de ativar a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), é a radiação ultravioleta (HANAWALT; SPIVAK, 2009). Dentre os danos gerados por ela, os principais (CPD e 6-4PP) são capazes de causar grandes distorções nas hélices da molécula de DNA e ativar a via do NER. Em busca de entender melhor o papel de TcCSB no reparo, as células heminocautas e superexpressoras para esse gene foram expostas a  $1500 \mu\text{J}/\text{m}^2$  de radiação ultravioleta, e o fenótipo foi analisado.

Os dados apresentados nos gráficos mostram que as células TcCSB<sup>+/-</sup>, são mais sensíveis 24 horas após o tratamento em comparação as células WT (Figura 24.A) foi observada uma sensibilidade em comparação as células WT. Apesar dessa sensibilidade, as células TcCSB<sup>+/-</sup> (CSB<sup>+/-</sup>) conseguem retornar ao seu crescimento, em 48 horas após o tratamento, mas de uma forma mais lenta do que as células WT. Avaliando a curva de crescimento das células superexpressora de CSB (TcCSB<sup>+</sup>), foi possível observar uma sensibilidade logo após o tratamento, mas as células sobreviventes voltaram a crescer (Figura 24.B). Analisando o gráfico de sobrevivência podemos observar que 1 hora após o tratamento, as células heminocautas (TcCSB<sup>+/-</sup>) e CL Brener (WT) tiveram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 70%, sendo mais resistentes do que as células superexpressoras (TcCSB<sup>+</sup>), que obteve uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 40% (Figura 24.C), resultado muito semelhante ao obtido por Mendes, 2015 com  $750 \mu\text{J}/\text{m}^2$  em PBS. Apesar da resistência inicial observada nas células TcCSB<sup>+/-</sup>, 24 horas após o tratamento foi observada uma sensibilidade em comparação as células WT, obtendo uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 20%, enquanto o WT apresentou uma taxa de 40% e 50% para as células TcCSB<sup>+</sup>.

Figura 24 — Curva e grafico de sobrevivência de células WT, TcCSB<sup>+</sup> e TcCSB<sup>+/-</sup> tratadas com 1500  $\mu\text{J}/\text{m}^2$  de UV-C



Legenda:

Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência frente a lesões causadas por 1500  $\mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$  em células epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (WT) em preto, heminocautes de TcCSB (TcCSB<sup>-/-</sup>) em verde e superexpressora de TcCSB (TcCSB<sup>+</sup>) em Azul;

**A)** Curva de crescimento de WT e TcCSB<sup>+/-</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h. Células TcCSB<sup>+/-</sup> são mais sensíveis 24 horas após o tratamento;

**B)** Curva de crescimento após exposição nas células WT e TcCSB<sup>+</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h e 72h. As TcCSB<sup>+</sup> apresentaram maior sensibilidade 1 hora após o tratamento, recuperando seu crescimento em 24 hrs;

**C)** Gráfico de sobrevivência após exposição nas células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup>, nos tempos de 1h e 24h após tratamento, apresentam menor sobrevivência nas células TcCSB<sup>+</sup> 1 e nas células TcCSB<sup>+/-</sup> 24 horas após o tratamento (\***P**<0.05, teste *t* student).

Fonte: De autoria própria.

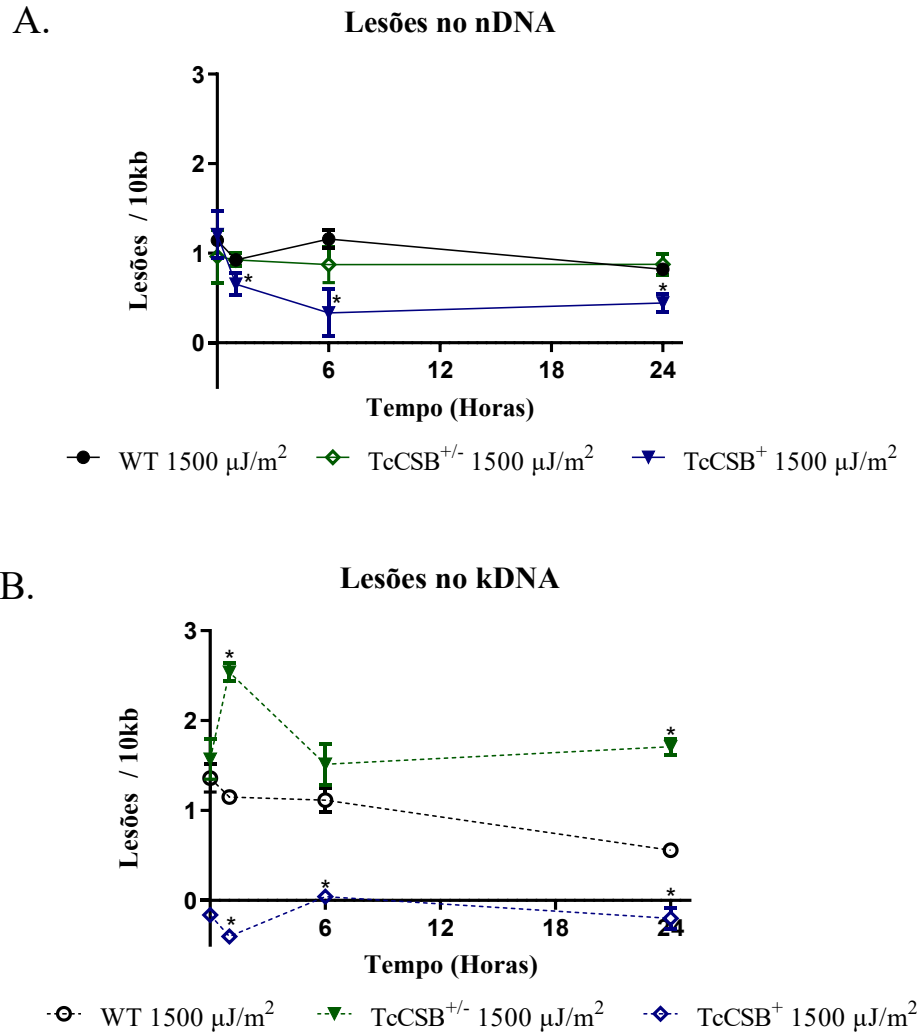
#### 4.3.4 Análise do número de lesões por *long range* qPCR com UV-C

A radiação ultravioleta (UV) é um agente genotóxico que leva à formação de lesões em ambos os genomas (mitocondrial e nuclear). No entanto, ainda não está descrito como essas lesões são reparadas nas mitocôndrias. Como um dos objetivos deste trabalho é estudar o envolvimento de TcCSB nas lesões mitocondriais, realizamos uma quantificação de danos nas células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup>, em ambos os genomas. Para isso, tratamos essas células com 1500  $\mu\text{J}/\text{m}^2$  de radiação UV-C e, posteriormente, foi realizada a técnica de qPCR para quantificação de lesões.

Após o tratamento, foi realizada a quantificação de danos no DNA nuclear, onde verificamos que a cepa selvagem (Figura 25.A) apresenta uma pequena queda nas lesões na primeira hora; um aumento no número de lesões de 1 a 6 horas; e, finalmente, uma pequena queda entre 6 e 24 horas. Esses resultados são consistentes com dados anteriores obtidos para esse tratamento (RAJAO, 2011). No entanto, nas células TcCSB<sup>+/-</sup> (Figura 25.A), não foi observada uma diminuição das lesões com o passar das horas. Pelo contrário, parece haver uma tendência de um pequeno aumento no número de lesões 1 hora após o tratamento. As células TcCSB<sup>+</sup> (Figura 25.A), ao contrário das células WT e TcCSB<sup>+/-</sup> apresentou uma cinética de reparo mais eficiente, representada por uma queda acentuada na primeira hora, seguida de uma queda mais lenta até as 6 horas, e um determinado número de lesões permaneceu constante de 6 a 24 horas após o tratamento. Esses resultados destacam a importância do papel de TcCSB no reparo nuclear frente a lesões causadas por UV, uma vez que, por meio da quantificação dos danos, demonstrou-se que as células TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup> apresentaram alterações em sua cinética de reparo em comparação com as células WT.

A quantificação de lesões no kDNA mostrou um comportamento diferente do observado no núcleo (Figura 25.B). As células WT apresentaram uma pequena queda de lesões na primeira hora; uma estabilização no número de lesões de 1 a 6 horas; e, por último, uma queda entre 6 e 24 horas. Esses resultados são consistentes com dados anteriores obtidos nas células WT (RAJAO, 2011). Ao avaliar as células TcCSB<sup>+/-</sup>, observamos um aumento das lesões 1 hora e, posteriormente, uma pequena queda observada até 6 horas, onde o número de lesões se mantém até 24 horas (Figura 25.B). Curiosamente, não conseguimos detectar lesões no kDNA nas células TcCSB<sup>+</sup>. Com esses dados, mostramos evidências de que as células superexpressoras são mais eficientes no reparo de DNA, enquanto a deficiência desse gene revelou complicações no reparo das lesões causadas por UV-C.

Figura 25 — Cinética de reparo de lesões causadas por  $1500 \mu\text{J}/\text{m}^2$  UV-C em células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup>



Legenda:

Cinética do reparo de lesões causadas  $1500 \mu\text{J}/\text{m}^2$  de radiação UV-C no núcleo e mitocôndria de células selvagem (Wt) e células Heminocaute (CSB<sup>+/-</sup>) e superexpressoras de CSB (CSB<sup>+</sup>), as medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, 6 horas e 24 horas após o tratamento.

A. Cinética de reparo nuclear, linhas contínuas Wt em preto, CSB<sup>+/-</sup> em verde e CSB<sup>+</sup> em azul. Células CSB<sup>+</sup> e CSB<sup>+/-</sup>, tem sua cinética de reparo nuclear alterada em comparação ao WT

B. Cinética de reparo mitocondrial, linhas pontilhadas Wt em preto e CSB<sup>+/-</sup> em verde e CSB<sup>+</sup> em azul. Células CSB<sup>+</sup> e CSB<sup>+/-</sup> tem sua cinética de reparo mitocondrial alterada em comparação ao WT (\*  $P < 0,05$ , teste t student).

Fonte: De autoria própria.

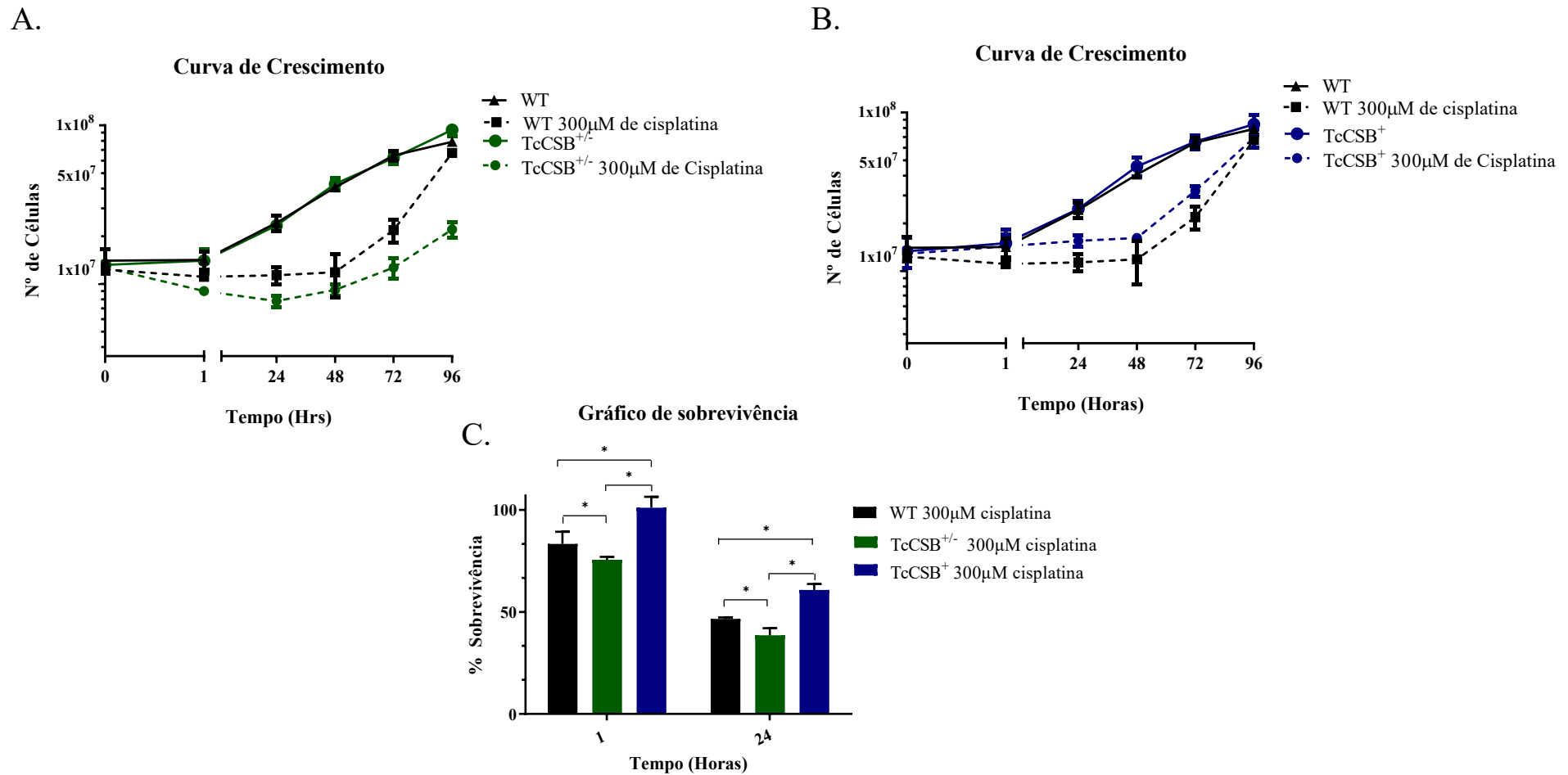
#### 4.3.5 Resposta do *T. cruzi* a cisplatina

Os adultos DNA-cisplatina são reparados primariamente pelo reparo por excisão de nucleotídeos (FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006; WANG; LIPPARD, 2005). Em busca de entender melhor o papel de TcCSB no reparo desse organismo, as células CL Brener (WT), TcCSB<sup>+</sup> e TcCSB<sup>+/-</sup>, foram expostas a 300 µM de cisplatina.

Os resultados obtidos mostraram que as células TcCSB<sup>+</sup> foram mais resistentes do que as células WT. Essas últimas apresentaram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 85% 1 hora após o tratamento, enquanto as células TcCSB<sup>+</sup> tiveram uma taxa de sobrevivência aproximada de 100% (Figura 26.C). Além da morte observada logo após o tratamento com cisplatina, houve uma parada no crescimento das células WT sobreviventes, assim como das células TcCSB<sup>+</sup> (Figura 26.B).

Contudo, também foi observado que as células sobreviventes da linhagem TcCSB<sup>+</sup>, assim como as células WT, tiveram o seu crescimento pausado até 48 horas (Figura 26.B). Foi observada uma pequena diferença na sobrevivência das células TcCSB<sup>+/-</sup> em comparação com as células WT 1 hora após o tratamento. Essa diferença acentuou em 24 horas após o tratamento, onde foi observado que as células TcCSB<sup>+/-</sup> tiveram uma taxa de sobrevivência de 40% contra os 50% do WT (Figura 26.C). Além de apresentaram uma sensibilidade maior na curva de crescimento em comparação com as células WT, inclusive tendo a retomada no crescimento de forma mais lenta que as células TcCSB<sup>+</sup> e as células WT (Figura 26.A).

Figura 26 — Curva e gráfico de sobrevivência como resposta de lesões causadas por 300µM de cisplatina em células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup> de *T.cruzi*



Legenda: Curvas de crescimento e gráfico de sobrevivência a exposição à 300µM de cisplatina em células epimastigotas de *T.cruzi* selvagens (WT) em preto, heminocautes de TcCSB (TcCSB<sup>+/-</sup>) em verde e superexpressora de TcCSB (TcCSB<sup>+</sup>) em Azul;

**A)** Curva de crescimento de WT e TcCSB<sup>+/-</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. Células TcCSB<sup>+/-</sup> são mais sensíveis após o tratamento;

**B)** Curva de crescimento após exposição nas células WT e TcCSB<sup>+</sup> nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. As células TcCSB<sup>+</sup> São mais resistentes que as células WT. **C)** Gráfico de sobrevivência após exposição nas células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup>, nos tempos de 1h e 24h após tratamento as células TcCSB<sup>+/-</sup> apresentam menor sobrevivência (\***P<0.05, teste t student**).

#### 4.3.6 Análise do número de lesões por *long range* qPCR com cisplatina

A cisplatina, assim como a radiação ionizante, é um agente genotóxico que leva à formação de lesões em ambos os genomas (mitocondrial e nuclear). Ainda não está descrito como essas lesões são reparadas nas mitocôndrias, e com o intuito de entender melhor o papel de TcCSB no reparo desse organismo, as células CL Brener (WT), TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup> foram expostas a 300 µM de cisplatina e posteriormente feita a *long range* qPCR.

A quantificação de lesões por *long range* qPCR revelou padrões distintos no reparo do DNA nuclear e mitocondrial após o tratamento com cisplatina. A quantificação de danos ao DNA nuclear mostrou que a cepa selvagem (Figura 27.A) apresenta um reparo rápido com uma grande queda do número de lesões na primeira hora, seguido de uma manutenção dos números de lesões de 1 a 6 horas, e, por último, uma queda lenta com reparo total de lesões entre 6 e 24 horas. Esses resultados são condizentes com dados anteriores obtidos para esse tratamento (RAJAO, 2011).

No entanto, nas células TcCSB<sup>+/-</sup> (Figura 27.A), apesar de ser observada uma diminuição na primeira hora, não é tão acentuada como no WT. Essa queda continua lentamente até 6 horas após o tratamento, seguida por mais uma queda lenta até 24 hrs.

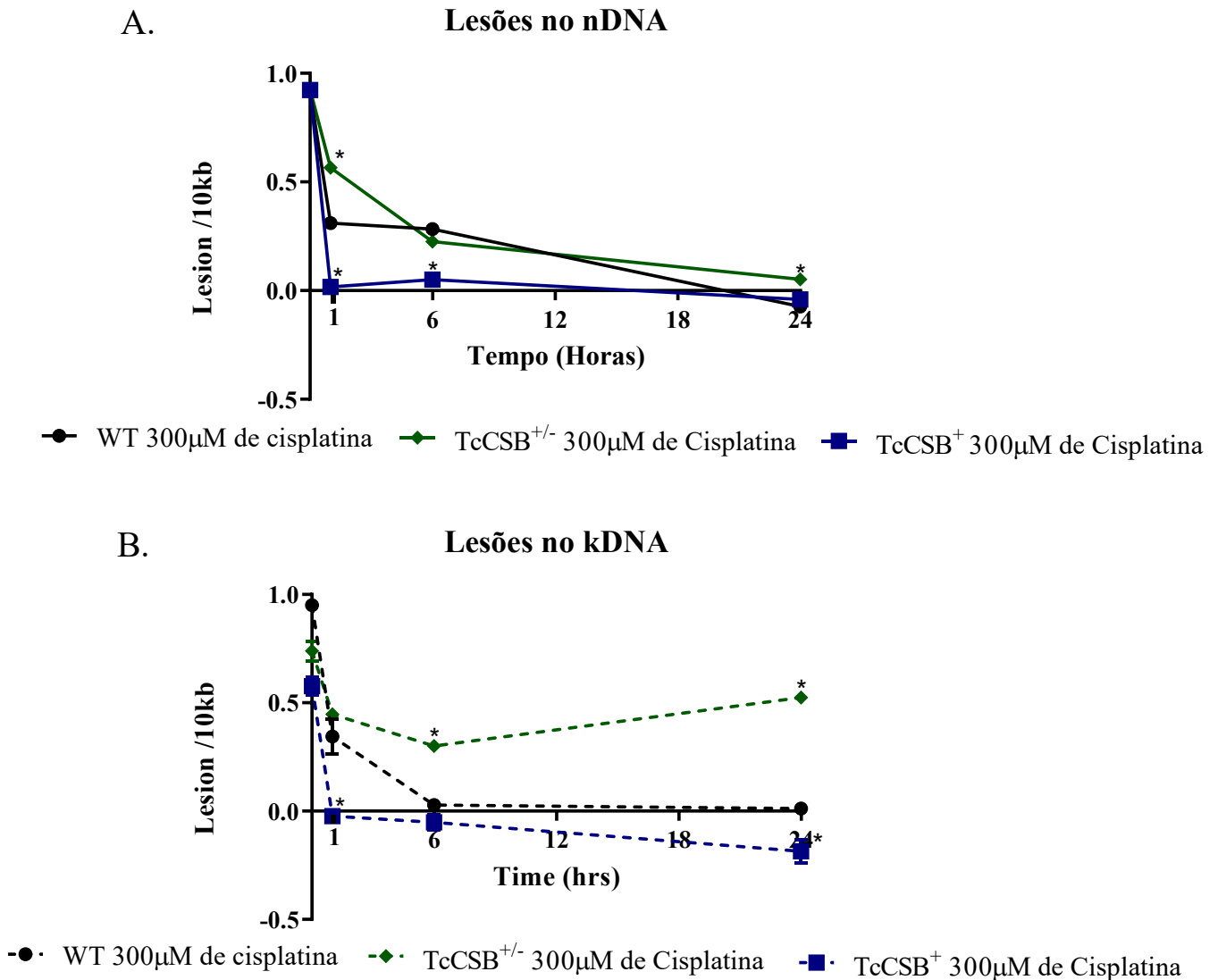
As células TcCSB<sup>+</sup> (Figura 27.A) apresentou uma queda total do número de lesões, finalizando o reparo nessa etapa. Esses resultados demonstram a importância do papel de TcCSB no reparo nuclear frente a lesões causadas por cisplatina, uma vez que, por meio da quantificação dos danos, observou-se que as cepas heminocautas e superexpressoras de TcCSB apresentaram alterações em sua cinética de reparo em comparação com a cepa WT.

A quantificação de lesões no kDNA demonstrou que as WT lidam melhor com essas lesões no kDNA do que no nDNA. Apesar de mostrar semelhanças na cinética na primeira hora com o núcleo, em que é possível observar uma queda rápida no número de lesões na primeira hora após o tratamento (Figura 27.B), essa queda se mantém levando ao desaparecimento de todas as lesões até 6 horas após o tratamento. Este resultado é condizente com dados anteriores obtidos para esse tratamento na célula WT (RAJAO, 2011).

No entanto, nas células TcCSB<sup>+/-</sup> (Figura 27.B), apesar de ser observada uma diminuição na primeira hora, não é tão acentuada como no WT. No segundo momento de reparo, é observada uma pequena queda no número de lesões 6 horas após o tratamento, contudo o número de lesões aumenta de 6 a 24 hrs (Figura 27.B). Nas células TcCSB<sup>+</sup>, observamos apenas reparo na primeira hora, onde todas as lesões somem. Esses dados evidenciam um atraso no

processo de reparo em células deficientes de TcCSB, assim como uma maior eficiência no desaparecimento de lesões nas células superexpressoras de TcCSB.

Figura 27 — Cinética de reparo de lesões causadas por cisplatina em células WT, CSB<sup>+/-</sup> e CSB<sup>+</sup>



Legenda:

Cinética do reparo de lesões causadas 300 μM de cisplatina no núcleo e mitocôndria de células selvagem (Wt) e células Heminocaute (CSB<sup>+/-</sup>) e superexpressoras de CSB (CSB<sup>+</sup>), as medições foram feitas logo após (15 minutos), 1 hora, 6 horas e 24 horas após o tratamento;

A. Cinética de reparo nuclear, linhas contínuas Wt em preto, CSB<sup>+/-</sup> em verde e CSB<sup>+</sup> em azul. Células CSB<sup>+</sup> e CSB<sup>+/-</sup>, tem sua cinética de reparo nuclear alterada em comparação ao WT;

B. Cinética de reparo mitocondrial, linhas pontilhadas Wt em preto e CSB<sup>+/-</sup> em verde e CSB<sup>+</sup> em azul. Células CSB<sup>+</sup> e CSB<sup>+/-</sup> tem sua cinética de reparo mitocondrial alterada em comparação ao WT. (\* P<0,05, teste t student).

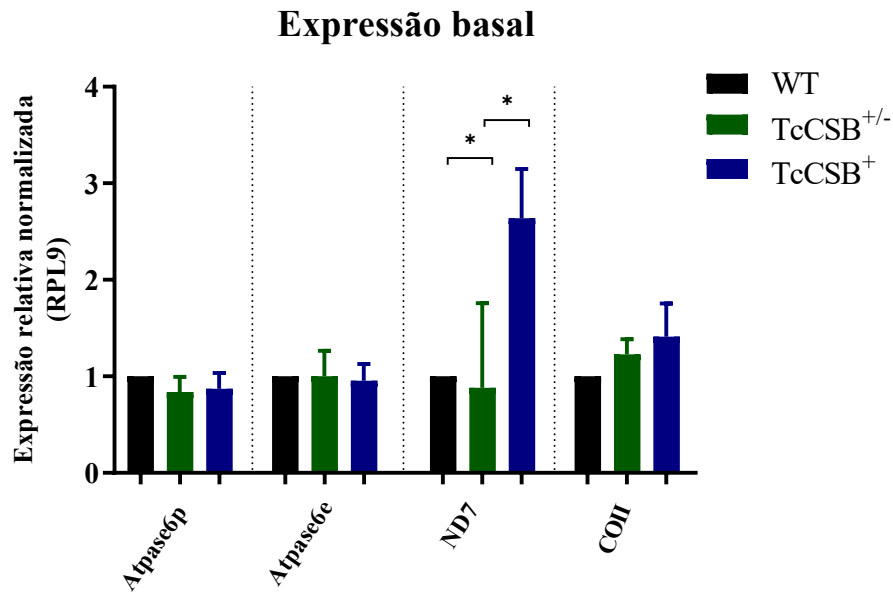
Fonte: De autoria própria.

#### 4.3.7 Análise do número de transcritos por *real time*

As evidências coletadas até o momento indicam que TcCSB está envolvido no reparo de lesões volumosas na mitocôndria de *T. cruzi*. Para investigar se está relacionado a algum processo de reparo transcricional, como o TC-NER, decidimos avaliar os níveis de transcritos de alguns genes mitocondriais por PCR em tempo real, tanto na condição normal de cultivo quanto sob estresse causado por cisplatina. Os seguintes genes mitocondriais foram avaliados: Subunidade 2 do citocromo C oxidase (COII), subunidade 6 da ATP sintase (ATP6e e ATP6p) e subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7). A cisplatina foi escolhida por ser descrita na literatura como principal agente capaz de formar adutos de DNA-cisplatina, levando à parada do processo de transcrição (FRIEDBERG, 2011; WANG; LIPPARD, 2005).

Antes de avaliarmos os números de transcritos em situação de estresse genotóxico, examinamos as condições basais desses transcritos na mitocôndria do *T. cruzi*. O gráfico demonstrou (Figura 28) que em condições basais, os números de transcritos de ATP6e, ATP6p e COII não apresentam diferenças entre as células WT, TcCSB<sup>+</sup> e TcCSB<sup>+/-</sup>. Ao avaliarmos os transcritos do gene ND7, observamos que os transcritos das células TcCSB<sup>+/-</sup> e WT não apresentam diferenças estatísticas. No entanto, os números de transcritos desse gene nas células TcCSB<sup>+</sup> estão aproximadamente 270% maiores do que nas células WT e TcCSB<sup>+/-</sup>.

O próximo passo então foi desafiar as células WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup> ao tratamento com 300 µM de cisplatina, e os números dos transcritos ATP6e, ATP6p, COII e ND7 foram avaliados. Observou-se que os números de transcritos para COII (Figura 29.A) foram alterados logo após o tratamento (0h). Foi possível observar que nas células TcCSB<sup>+/-</sup> a expressão relativa caiu para aproximadamente 40%, enquanto nas células TcCSB<sup>+</sup> caiu para aproximadamente 70% em relação às células WT. Após 1 hora do tratamento, os números de transcritos das células TcCSB<sup>+</sup> subiram para aproximadamente 160%, enquanto nas células TcCSB<sup>+/-</sup> ficaram em torno de 50% em relação às células WT. Após 5 horas do tratamento, as células WT aumentaram os números, assim como as células TcCSB<sup>+</sup>, cujo número de transcritos chegou a 200% em relação à condição não tratada. Enquanto isso, as células TcCSB<sup>+/-</sup> mantiveram o número de transcritos igual à condição não tratada.

Figura 28 — Expressão basal de genes mitocondriais em cepa WT, TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCCSB<sup>+</sup>

Legenda: Número de transcritos em condições de cultivo de genes mitocondriais, em células selvagens (WT) em preto, heminocautes CSB (TcCSB<sup>+/-</sup>) em verde e superexpressoras de CSB (TcCSB<sup>+</sup>) em azul. Os transcritos são: Subunidade 2 do citocromo C oxidadase (COII), subunidade 6 da ATP Sintase (ATP6e e ATP6p), subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7), apenas o transcrito ND7 apresenta mais expresso nas células TcCSB<sup>+</sup> (\*P<0.05, teste *t* student).

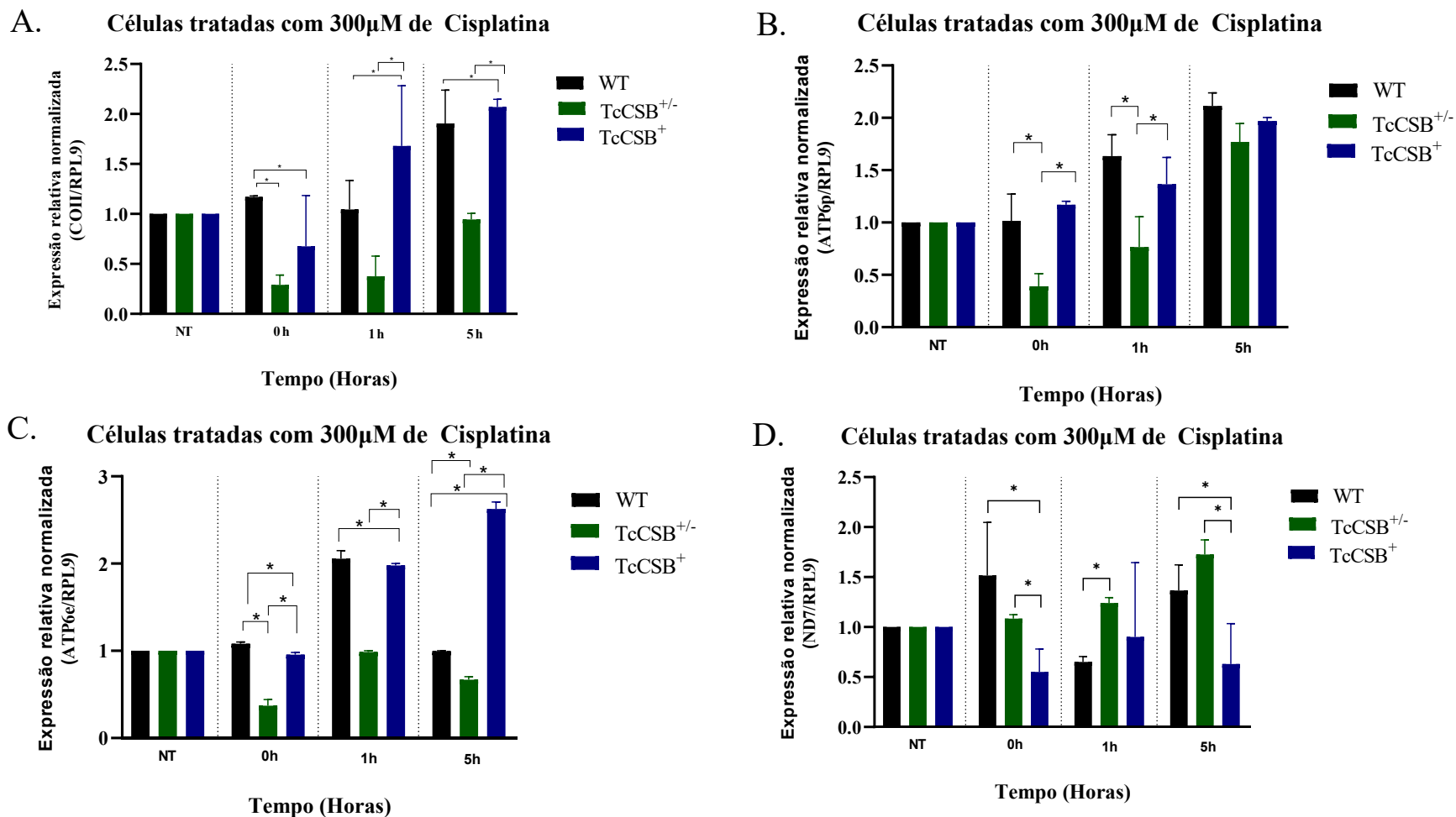
Fonte: De autoria própria.

O transcrito do gene ATP6 é extremamente editado, para verificarmos o processo de transcrição e se poderia haver alteração nos processos de edição, decidimos construir *primers* que pegam o pré-m-RNA (ATP6p), assim como *primers* que pegam o transcrito maduro (ATP6e). Em relação ao pré-mRNA de ATP6 (Figura 29.B), não foram observadas diferenças estatísticas entre as cepas WT e TcCSB<sup>+</sup> em nenhum dos tempos observados. Curiosamente, ambas seguiram o mesmo perfil de aumento no número de transcritos. Sendo eles aproximadamente 150% na primeira hora após o tratamento, aproximadamente 200% na quinta hora após o tratamento. Quando formos avaliar as células TcCSB<sup>+/-</sup>, observamos que essas células tiveram uma queda de 50% logo após o tratamento e se mantendo até 1 hora após o estresse. As células TcCSB<sup>+/-</sup>, acabou se equiparando aos números de transcritos das células WT e TcCSB<sup>+</sup> 5 horas após o estresse genotóxico, atingindo também aproximadamente 200% do número de transcritos da condição não tratada.

Avaliando então o transcrito editado da ATP6 (ATP6e) (Figura 29.C), foi possível observar que a cepa TcCSB<sup>+/-</sup> teve novamente uma queda para aproximadamente 50%, e na

cepa TcCSB<sup>+</sup> uma queda para 90% do número de transcritos logo após o tratamento genotóxico. Sendo assim, 1 hora após o estresse, tanto as células TcCSB<sup>+</sup> como as WT tiveram um aumento de aproximadamente 200% no número de transcritos, enquanto as células TcCSB<sup>+/-</sup> restauraram o número de transcritos para as condições sem estresse. Curiosamente, 5 horas após o estresse, as células TcCSB<sup>+</sup> mantiveram elevado o número de transcritos em torno de 200%, enquanto as células WT voltaram o número de transcritos para a condição basal, e as células TcCSB<sup>+/-</sup> caíram para aproximadamente 90% da condição basal.

O último gene avaliado foi o ND7 (Figura 29.D). Diferentemente dos outros avaliados, o número de transcritos caiu significativamente apenas nas células TcCSB<sup>+</sup> para aproximadamente 50% logo após o tratamento (0h), enquanto nas células selvagens o número de transcrito subiu para aproximadamente 150%, e a cepa TcCSB<sup>+/-</sup> manteve o número de transcritos semelhante à condição de não estresse. Uma hora após o tratamento, o número de transcritos da cepa WT caiu para aproximadamente 70%, enquanto a TcCSB<sup>+</sup> recuperou os números transcritos, para a quantidade basal, igual à cepa TcCSB<sup>+/-</sup>. Curiosamente, o número de transcritos da cepa WT e TcCSB<sup>+/-</sup> voltou a subir para aproximadamente 150% 5 horas após o tratamento, enquanto na cepa TcCSB<sup>+</sup> se manteve semelhante à condição basal.



Legenda: Número de transcritos em condições de estresse com 300 μM de cisplatina nos tempos 0h, 1h e 5h horas após o tratamento, Células WT em preto, células TcCSB<sup>+/-</sup> em verde e células TcCSB<sup>+</sup> em azul, todos os alvos foram normalizados com RPL9;

A. Número de transcritos do gene COII, apresenta maior queda nas células TcCSB<sup>+/-</sup>;

B. Número de transcritos para o pré-mRNA do gene ATP6, apresenta maior queda nas células TcCSB<sup>+/-</sup> nos tempos 0h e 1h;

C. Número de transcritos para o mRNA maduro do gene ATP6, apresenta maior queda nas células TcCSB<sup>+/-</sup>;

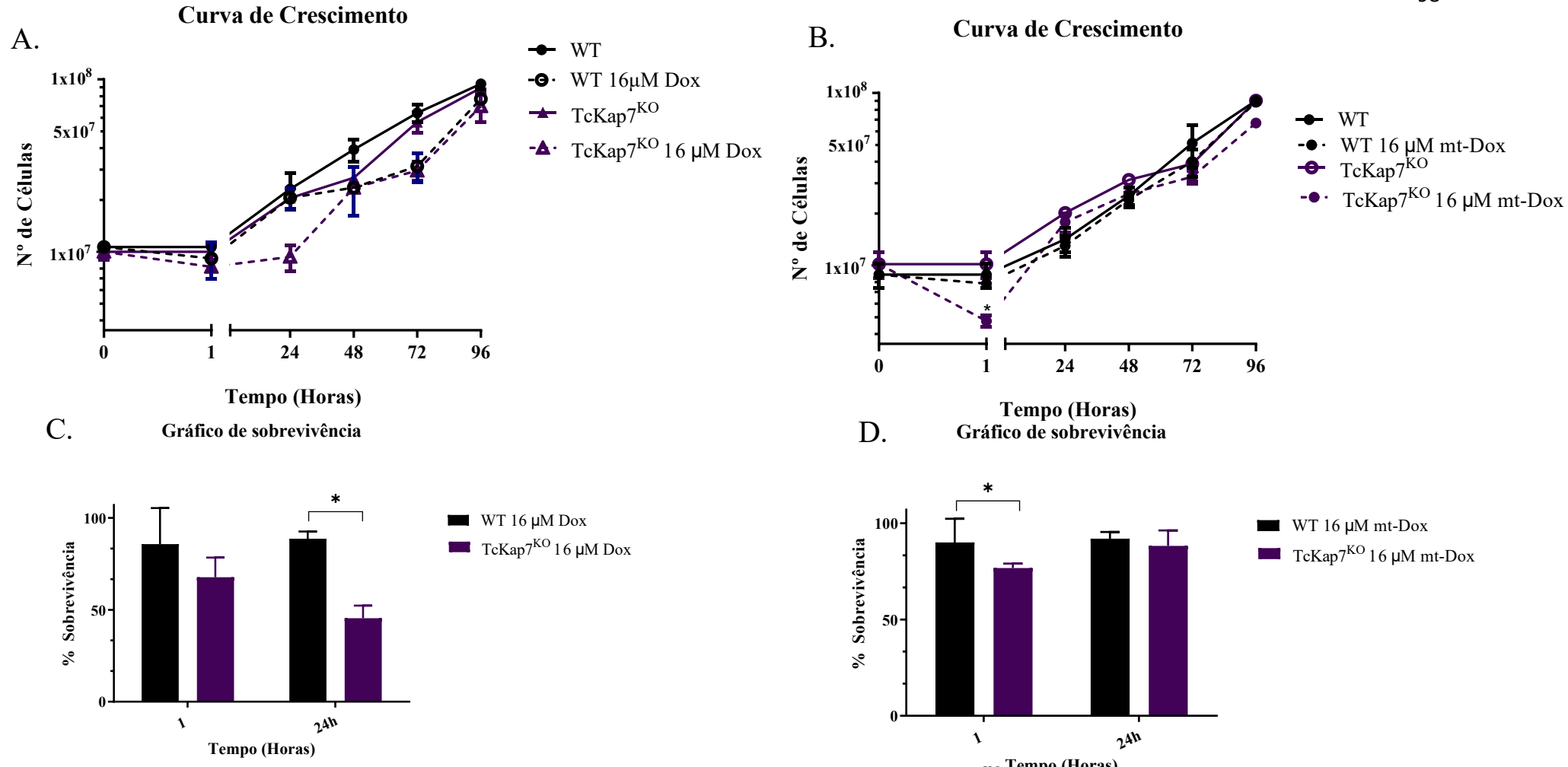
D. Número de transcritos para o pré-mRNA do gene ND7 apresenta menor número de transcritos nas células TcCSB<sup>+</sup> nos tempos 0 e 5hrs e nas células WT no tempo de 1h. (\*P<0.05, teste t student).

#### 4.3.8 Resultados com células nocaute de TcKap7

Para continuar investigando o reparo transcricional na mitocôndria do *T. cruzi*, além da proteína CSB, decidimos avaliar o envolvimento da proteína TcKAP7, como dito anteriormente, proteínas associadas ao cinetoplasto estão envolvidas com diversas funções relacionadas ao kDNA dos tripanossomatídeos. A proteína TcKAP7 tem revelado um importante papel na mitocôndria de *T. cruzi*, nosso grupo coletou evidências de seu envolvimento no reparo de lesões que levam à distorção da dupla fita do kDNA, principalmente nas horas iniciais (REPOLÊS, 2019). Para podermos entender melhor o seu papel frente a essas lesões, e se a mesma estava envolvida em conjunto com TcCSB decidimos avaliar o seu fenótipo, assim como da DM28c (WT) por meio de tratamento com 16  $\mu$ M de Dox, Mt-Dox e cisplatina.

#### 4.3.9 Resposta das células TcKap7<sup>KO</sup> a Dox e mt-Dox

Nas células tratadas com Dox (Figura 30.A), não obtivemos diferenças significativas entre as células TcKap7<sup>KO</sup> e WT 1 hora após o tratamento ambas as células tiveram uma pequena sensibilidade, apesar das células TcKap7<sup>KO</sup> apresentarem uma tendência de serem mais sensíveis. Contudo, foi observado uma parada no crescimento apenas nas células TcKap7<sup>KO</sup> 24 horas após o tratamento, o que levou a uma taxa de sobrevivência de 50% em 24 horas das células TcKap7<sup>KO</sup>. Diferentemente do tratamento com Dox, os resultados obtidos com a mt-Dox (Figura 30.B) mostraram que as células TcKap7<sup>KO</sup> foram mais sensíveis na primeira hora após o tratamento, tendo uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 50% , enquanto as células WT tiveram uma taxa de sobrevivência de 90% (Figura 30.C). Entretanto, após esse primeiro momento, as células nocaute retomaram o seu crescimento normalmente, o que pode indicar que a sua ausência interfere apenas nesse momento inicial. Enquanto foi observado uma resposta mais tardia com a utilização de Dox.



Legenda:

Resposta a lesões causadas por Dox em células selvagens (WT) em preto e nocautes de Tckap7 (TcKAP7<sup>KO</sup>) em roxo de *T. cruzi*;

**A)** Curva de crescimento de WT e TcKAP7<sup>KO</sup> após exposição à 16µM de Dox, nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. As células TcKAP7<sup>KO</sup> apresentaram sensibilidade e parada no crescimento 24 horas após o tratamento;

**B)** Curva de crescimento de WT e TcKAP7<sup>KO</sup> após exposição à 16µM de mt-Dox, nos tempos 1h, 24h, 48h, 72h e 96h. As células TcKAP7<sup>KO</sup> foram sensíveis logo após o tratamento, retornando o seu crescimento;

**C)** Gráfico de sobrevivência após exposição à 16µM de Dox nas células WT e TcKAP7<sup>KO</sup> nos tempos 1h e 24h após tratamento, o gráfico mostra uma menor taxa de sobrevivência nas células TcKAP7<sup>KO</sup> 24 horas após o tratamento;

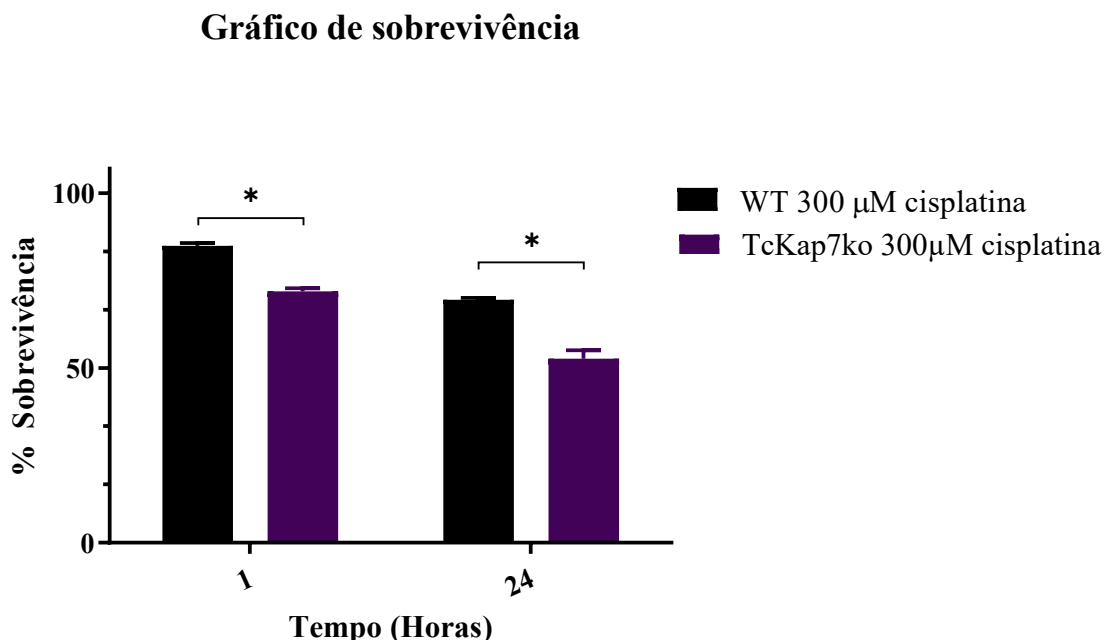
**D)** Gráfico de sobrevivência após exposição à 16µM de mt-Dox nas células WT e TcKAP7<sup>KO</sup> nos tempos 1h e 24h após tratamento, aonde foi possível observar uma sensibilidade nas células TcKAP7<sup>KO</sup> apenas 1 hora logo após o tratamento (**\*P<0.05, teste t student**).

#### 4.3.10 Análise do número de transcritos por Real time

Como as células nocautes de TcKap7, apresentam sensibilidade nos momentos iniciais após o estresse com agentes genotóxicos que para o processo transcricional. Decidimos verificar nas células deficientes em TcKap7 os níveis de transcritos de alguns genes mitocondriais por PCR em tempo real nas condições normais de cultivo, assim como sob estresse causado pelo agente genotóxico cisplatina.

Curvas de sobrevivência em células nocautes de TcKap7 com esse fármaco já haviam sido realizadas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (REPOLÊS, 2019). Foi realizado um gráfico de sobrevivência, foi observado que as células nocautes de TcKap7 são mais sensíveis uma hora após o tratamento, tendo uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 60% na dosagem de 300 $\mu$ M 1 hora após o tratamento, enquanto as células WT tem uma taxa de 90%. A sensibilidade se mantém 24 horas após o tratamento, tendo 50% de sobrevivência nas células nocautes e 65% nas células WT (Figura 31).

Figura 31 — Sobrevivência de TcKap7<sup>KO</sup> após o tratamento com 300 $\mu$ M de cisplatina

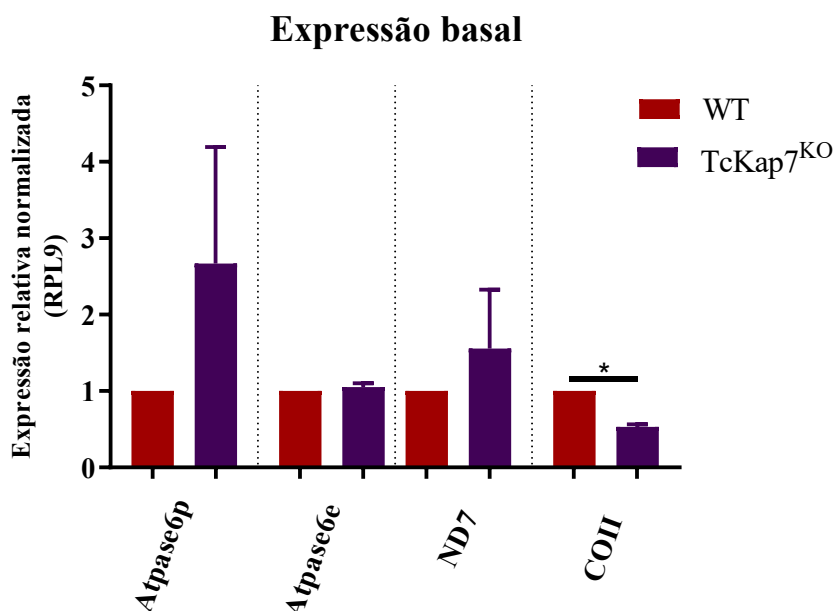


Legenda: Sobrevivência das células WT em preto e TcKap7<sup>KO</sup> em roxo expostas á 300 $\mu$ M de cisplatina. Células TcKAP7<sup>KO</sup> foram mais sensíveis 1 hora após o tratamento, apresentando 60% de sobrevivência, enquanto o WT apresentou 90%. As células TcKAP7<sup>KO</sup> continuaram mais sensíveis 24 horas após apresentando 60% de sensibilidade, enquanto 75% das células WT. (\*p<0,05, teste t student)

Fonte: De autoria própria.

Para avaliarmos se a ausência desse gene alteraria o processo transcripcional em comparação com as células selvagens em condição de estresse gerado por cisplatina, avaliamos os seguintes genes mitocondriais: Subunidade 2 do citocromo C oxidase (COII), subunidade 6 da ATP Sintase (ATP6e e ATP6p), subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7). Os gráficos demonstraram que em condições basais (Figura 32), os números de transcritos dos genes ATP6 (ATP6e e ATP6p) e ND7 não apresentaram diferenças estatísticas, contudo o gene COII apresentou um número de transcrito menor em células nocautes de TcKap7 em condições basais.

Figura 32 — Expressão basal de genes mitocondriais em células WT e TcKap7<sup>KO</sup>



Legenda: Número de transcritos em condições de cultivo de genes mitocondriais, em células DM28c (WT) em vermelho e nocautes de TcKap7 (TcKap7<sup>KO</sup>) em roxo. Os transcritos são: Subunidade 2 do citocromo C oxidase (COII), subunidade 6 da ATP Sintase (ATP6e e ATP6p), subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7). (\*p<0,05, teste t student)

Fonte: De autoria própria.

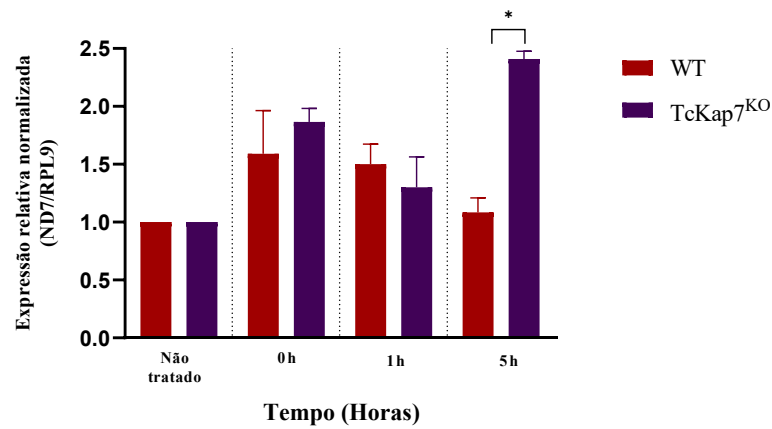
As células TcKap7<sup>KO</sup> e WT foram expostas a 300  $\mu$ M de cisplatina, depois foi realizado os experimentos de qPCR. Os números dos transcritos ATP6e, ATP6p, COII e ND7 foram avaliados. Os números de transcritos para ND7 (Figura 33A) tiveram alterações nas células WT e TcKap7<sup>KO</sup>, aumentando os números de transcritos logo após o tratamento, assim como uma hora, contudo não houve diferença estatística entre as células WT e TcKap7<sup>KO</sup> nesses tempos.

Cinco horas após o tratamento, as células TcKap7<sup>KO</sup> apresentaram um número de transcritos maior que as células WT, enquanto as células WT retornaram seus transcritos para aproximadamente a condição basal.

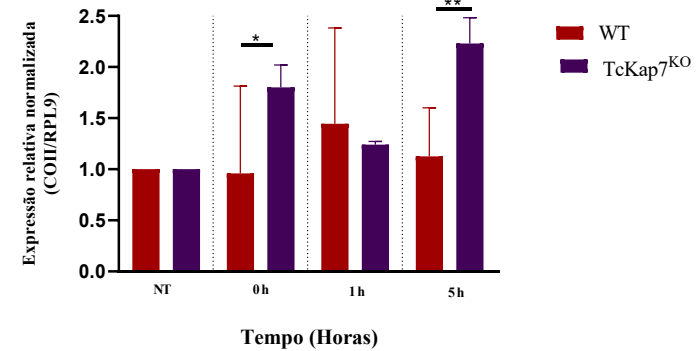
Ao avaliar o número de transcritos do gene COII (Figura 33B), foi possível observar que logo após o tratamento, os números de transcritos das células TcKap7<sup>KO</sup> aumentam 180% em relação as células WT, enquanto as células WT se mantem próximo a condição basal. Contudo 1 hora após o tratamento, os números de transcritos das células TcKap7<sup>KO</sup> voltaram a condição basal se igualando as células WT, e voltaram a aumentar cinco horas após o estresse. Apesar das células WT apresentarem oscilações, não apresentam diferenças estatísticas com a condição basal.

Como mencionado anteriormente, o transcrito do gene ATP6 é extremamente editado. Para verificar o processo de transcrição e possíveis alterações nos processos de edição, decidimos construir primers que amplificam o pré-mRNA (ATP6p) e primers que amplificam o transcrito maduro (ATP6e). Com relação ao pré-mRNA de ATP6 (Figura 33.C), não foi observada diferença estatística entre as cepas selvagens e nocaute de TcKap7 nos tempos de 0h, 1h e 5h após o tratamento. Apesar de notarmos uma alteração significativa no tempo de 5h em relação às condições basais. Ao avaliar os números de transcritos do m-RNA maduro de ATP6 (ATP6e) (Figura 33.D), logo após o estresse com cisplatina (0h) foi possível observar um aumento do número de transcritos nas células nocautes de TcKap7. Esse aumento foi revertido no tempo de uma hora após o tratamento e, curiosamente, caiu cinco horas após o tratamento, onde o número de transcrito está menor nas células TcKap7<sup>KO</sup> do que nas células WT.

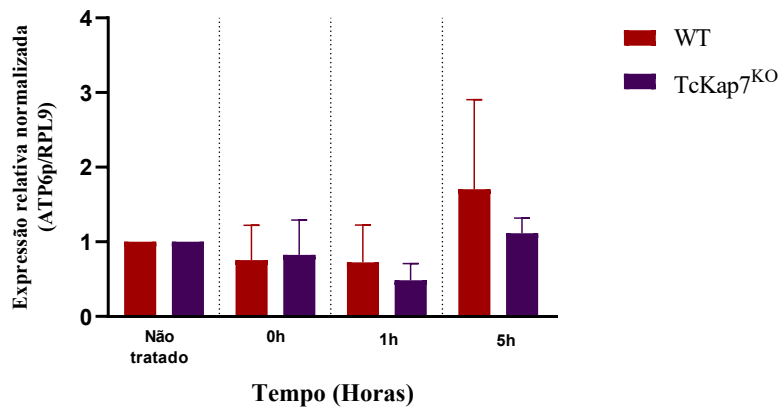
A. Células tratadas com 300µM de Cisplatina



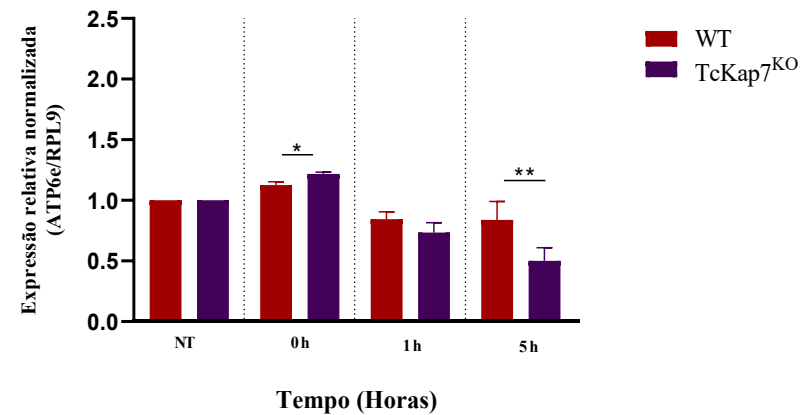
B. Células tratadas com 300µM de Cisplatina



C. Células tratadas com 300µM de Cisplatina



D. Células tratadas com 300µM de Cisplatina



Legenda:  
5hrs

Número de transcritos em condições de estresse com 300 µM de cisplatina em células WT em vermelho e nocautes de TcKap7 em roxo, nos tempos de 0h, 1h e 5hrs

A. Número de transcritos do gene ND7, apresentou um aumento 5 horas após o tratamento nas células TcKap7<sup>KO</sup>

B. Número de transcritos do gene COII, apresentou um aumento nos tempos 0h e 5h após o tratamento nas células TcKap7<sup>KO</sup>

C. Número de transcritos do pre-mRNA do gene ATP6; não apresentou diferenças.

D. Número de transcritos do mRNA maduro do gene ATP6; apresentou um aumento nas células TcKap7<sup>KO</sup> nos tempos 0h e 5h após o tratamento (\*P<0.05, teste t student).

## 5 DISCUSSÃO

Os estudos sobre reparo de DNA tiveram início na década de 1930, antes mesmo da descoberta de que o material genético era composto por DNA. Desde então, diversos mecanismos, como respostas biológicas ao dano ao DNA, foram descobertos. No final da década de 1970, tornou-se evidente que as células desenvolveram múltiplos mecanismos, evoluindo a partir de dois princípios básicos: a excisão do dano ou sua reversão direta (FRIEDBERG, 2008).

No entanto, apesar dos estudos sobre DNA remontarem aproximadamente 90 anos, a pesquisa envolvendo o genoma mitocondrial foi, por muito tempo, ofuscada pelo estudo do núcleo celular. Isso ocorreu devido a alguns fatos, sendo o primeiro relacionado ao tamanho, como o genoma núcleo humano, que é 200.000 vezes maior que o genoma mitocondrial, contendo cerca de 20.000 genes, enquanto as mitocôndrias humanas têm apenas 37 genes, dos quais apenas 13 codificam proteínas, as quais integram quatro dos cinco complexos da cadeia transportadora de elétrons (todos os complexos com exceção da FADH<sub>2</sub> desidrogenase) (HOLT, 2009). Além disso, a aparente incapacidade das mitocôndrias em remover dímeros de pirimidina após a exposição à luz ultravioleta (CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974) levou muitos a afirmarem erroneamente que as mitocôndrias não tinham a capacidade de reparar o DNA. Essa hipótese equivocada perdurou por muito tempo devido à dificuldade em purificar mitocôndrias e à ausência de genes de reparo em seu genoma.

No entanto, hoje sabemos que a maioria das proteínas de reparo são compartilhadas com o núcleo e, aparentemente, o reparo mitocondrial ocorre com menos proteínas do que no núcleo, embora ainda não saibamos como essas proteínas são direcionadas precisamente para essa organela (ALENCAR; BATALHA; FREIRE; DE SOUZA-PINTO, 2019; STEIN; SIA, 2017; YANG; WEISSMAN; BOHR; MATTSON, 2008). Portanto, não podemos simplesmente extrapolar as vias conhecidas de reparo nuclear para a mitocôndria, pois isso não proporcionaria uma compreensão clara do metabolismo do mtDNA. A descrição do reparo mitocondrial ainda é incompleta, e um complicador no estudo do reparo de DNA mitocondrial é que mamíferos, e outros eucariotos, possuem mais de uma mitocôndria, o que pode dificultar a percepção dos efeitos sobre o DNA mitocondrial. Esses efeitos só são percebidos quando atingem uma quantidade significativa de mitocôndrias. Inclusive, há estudos que indicam que níveis distintos de heteroplasmias estão relacionados ao surgimento ou não de determinados fenótipos (KOPINSKI; JANSSEN; SCHAEFER; TREFELY *et al.*, 2019; LECHUGA-VIECO;

LATORRE-PELLICER; JOHNSTON; PROTA *et al.*, 2020). Nesse contexto, o *Trypanosoma cruzi*, assim como outros kinetoplastidas, são excelentes organismos para o estudo do reparo do DNA mitocondrial, uma vez que apresentam uma única mitocôndria, embora ela seja modificada.

Dentre os agentes genotóxicos aos quais os organismos estão expostos, o estresse oxidativo constitui, senão a principal, uma das fontes mais relevantes de danos às biomoléculas (POHJOISMÄKI; BOETTGER; LIU; GOFFART *et al.*, 2012). Quando discutimos o *T. cruzi*, esse parasito é severamente exposto a esses agentes genotóxicos durante seu ciclo de vida, iniciando o contato já na parte inicial do intestino do barbeiro, principalmente devido ao grupo hemi, oriundo das hemácias, obtidas durante o repasto sanguíneo do vetor (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Além disso, na fase aguda da infecção, há a uma extensa produção de substâncias genotóxicas, como óxido nítrico (NO) e a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> pelas células do sistema imune, em resposta à infecção (MACALUSO; GRIPPI; DI BELLA; BLANDA *et al.*, 2023). Esses eventos levam à formação de danos intensos nos componentes celulares, que, direta ou indiretamente, resultam na formação de lesões no DNA.

Para enfrentar o estresse oxidativo, o *T. cruzi* dispõe de um sistema antioxidante dependente de várias enzimas, como tripanotiona redutase, glutathiona peroxidases, triparedoxina peroxidase, proteínas da família superóxido dismutases (SOD), entre outras (BERNÁ; CHIRIBAO; GREIF; RODRIGUEZ *et al.*, 2017; IRIGOÍN; CIBILS; COMINI; WILKINSON *et al.*, 2008; MACHADO-SILVA; CERQUEIRA; GRAZIELLE-SILVA; GADELHA *et al.*, 2016; MARTÍNEZ; PROLO; ESTRADA; RIOS *et al.*, 2019). Quando esse sistema não consegue lidar com esse estresse, há a formação de lesões no DNA do parasito, causando, principalmente, a oxidação da guanina em 8-oxoguanina, contudo, já foram descritas diversas lesões indiretas, inclusive a formação de DSBs, assim como diversas vias de reparo já foram associadas, mas a principal e mais estudada é o BER, em especial o sistema GO, que é uma subvia específica (FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que, mesmo após o desafio com altas doses de peróxido de hidrogênio, os níveis de lesão no kDNA do *T. cruzi* permanecem estáveis (FURTADO; KUNRATH-LIMA; RAJÃO; MENDES *et al.*, 2012; REPOLÊS, 2019). Também foi descrito o envolvimento das proteínas TcOGG1, TcMYH (KUNRATH-LIMA; REPOLÊS; ALVES; FURTADO *et al.*, 2017), DNA polimerase  $\beta$ , DNA polimerase  $\beta$ -Pak, DNA polimerase  $\kappa$  (DE OLIVEIRA LOPES; SCHAMBER-REIS; REGIS-DA-SILVA; RAJÃO *et al.*, 2008; SCHAMBER-REIS; NARDELLI; RÉGIS-SILVA; CAMPOS *et al.*,

2012) nessa via, dessa forma, elucidando uma subvia de BER mitocondrial coesa nesse organismo. Apesar de já termos coletado evidências de uma via capaz de detectar, reparar e tolerar 8-oxoguanina, que é a principal lesão ocasionada pelo estresse oxidativo, não foi determinado se outras vias de reparo também se encontram no cinetoplasto. Já é descrito que um subconjunto de danos oxidativos é removido por NER, recombinação homóloga e NHEJ (HENLE; LINN, 1997; HU; DUBIN; KURLAND; MA; ROUSH, 1995).

Nosso grupo de trabalho já demonstrou que o *T. cruzi* tem a capacidade de reparar lesões mitocondriais, geradas por cisplatina, radiação ultravioleta, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MMS (RAJAO, 2011; REPOLÊS, 2019). Contudo, tirando as evidências das enzimas descritas envolvidas na via BER, ainda não sabemos quais são as proteínas que estão envolvidas nas outras vias.

Dados do meu mestrado revelaram um papel relevante de TcRad51 na mitocôndria (FERREIRA, 2019). Rad51 é uma proteína que inicia o processo de invasão da dupla fita de DNA na fita homóloga adjacente, formando um D loop, buscando a região homóloga para realizar o reparo (FRIEDBERG; AGUILERA; GELLERT; HANAWALT *et al.*, 2006; HOLLOMAN, 2011). Como o *T. cruzi* não possui a via do NHEJ, depende apenas da via de recombinação homóloga para lidar com as quebras na dupla fita de DNA. TcRad51 já se mostrou envolvida na recombinação homóloga no DNA nuclear desse organismo e está relacionada à sua resistência a altas quantidades de radiação ionizante, assim como na geração de híbridos (ALVES; REPOLES; DA SILVA; MENDES *et al.*, 2018; PASSOS-SILVA; RAJÃO; NASCIMENTO DE AGUIAR; VIEIRA-DA-ROCHA *et al.*, 2010; REGIS-DA-SILVA; FREITAS; PASSOS-SILVA; FURTADO *et al.*, 2006).

Em busca de mais evidências sobre o reparo por recombinação homóloga na mitocôndria do *T. cruzi*, este trabalho inicialmente continuou a coletar evidências do envolvimento de TcRad51, assim como da topoisomerase 3 $\alpha$  (TcTopo3 $\alpha$ ), que vem sendo cada vez mais relatada com o envolvimento da manutenção da integridade do DNA mitocondrial em mamíferos (NICHOLLS; NADALUTTI; MOTORI; SOMMERVILLE *et al.*, 2018; TSAI; LIN; HSIEH, 2016; WANG; MILLER; MILTON; VICKER *et al.*, 2002). Já é bem descrito o seu papel na etapa final do reparo da recombinação homóloga, sendo uma das proteínas-chave do complexo que processa a junção de *holliday* (CICCIA; ELLEDGE, 2010; HARTUNG; SUER; KNOLL; WURZ-WILDERSINN; PUCHTA, 2008; SWUEC; COSTA, 2014).

O primeiro dos nossos desafios foi induzir lesões que levassem à formação de DSB apenas no kDNA. Conseguimos contornar esse problema por meio de uma parceria com o Kelley Lab,

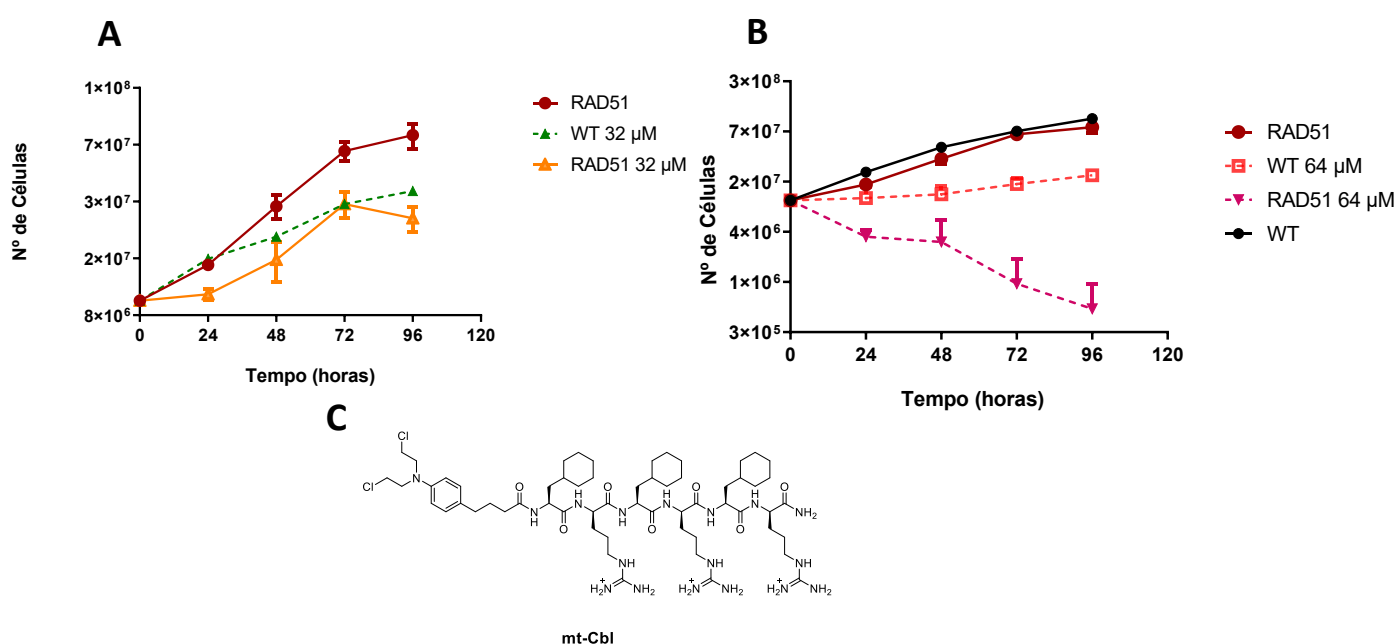
coordenado pela Prof. Dra. Shana O. Kelley, na University of Toronto, que nos forneceu uma doxorubicina (Dox) ligada a um peptídeo de captação mitocondrial, chamada, então, de mt-Dox. Como já descrito anteriormente, a Dox é um quimioterápico que leva à formação de adutos no DNA, indução de quebras de fita simples (SSB) e quebras de fita dupla (DSB). Inclusive, seu principal mecanismo de ação é pela inibição da topoisomerase II (COLDWELL; CUTTS; OGNIBENE; HENDERSON; PHILLIPS, 2008; FORREST; SWIFT; REPHAELI; NUDELMAN *et al.*, 2012; KCIUK; GIELECINSKA; MUJWAR; KOLAT *et al.*, 2023; SWIFT; REPHAELI; NUDELMAN; PHILLIPS; CUTTS, 2006). Em células humanas, teve uma distribuição exclusivamente mitocondrial, assim como a formação de lesões exclusivamente nessa organela (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013). Como o *T. cruzi* é um organismo diferente, decidimos verificar se esse peptídeo também estava direcionando corretamente para a mitocôndria do mesmo.

A doxorubicina é um composto naturalmente fluorescente, excitado a 490 nm. A fluorescência do mt-Dox se mostrou sobreposta apenas com a fluorescência do kDNA (Figura 16), demonstrando, assim, que esse peptídeo de captação mitocondrial está direcionando corretamente o agente genotóxico para a mitocôndria do *T. cruzi*, assim como em células humanas (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013). Também avaliamos o direcionamento da doxorubicina sem o peptídeo de captação (Figura 17), em que foi observada sua presença no kDNA e no nDNA. Como descrito anteriormente, é bem estabelecido na literatura que a doxorubicina tem como alvo principal o DNA nuclear, não apresentando a formação de lesão em mitocôndrias (CHAMBERLAIN; TULUMELLO; KELLEY, 2013; JEAN; TULUMELLO; RIGANTI; LIYANAGE *et al.*, 2015; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2016). Contudo, acreditamos que, devido à distribuição mitocondrial em humanos e à baixa quantidade de DNA no citoplasma em relação ao núcleo, possa comprometer o sinal de fluorescência da Dox, o que não acontece com o *T. cruzi* devido à sua estrutura modificada, que leva à condensação do seu DNA em um disco, que em microscopias, inclusive, tem um sinal de DAPI mais forte que o núcleo do mesmo. Assim, nós levamos ao questionamento, se não é relatado a formação de lesão em células de mamíferos: seria essas lesões também reparadas?

Podendo então utilizar um agente genotóxico que leva a formação de DSB no kDNA, realizando o tratamento com mt-Dox em células hemi-nocautas de TcRad51 (TcRad51<sup>+/-</sup>) nas quais foi observado uma diferença em 24 horas após o tratamento (Figura 17C), demonstrando assim que a depleção desse gene comprometeu o crescimento dessas células. Levando em consideração que o reparo por recombinação homóloga está ativo na fase S/G2 (GELOT; LE-

GUEN; RAGU; LOPEZ, 2016), espera-se que esse fenótipo seja observado entre 6 a 24 horas. Devido ao tempo de replicação celular do *T. cruzi* ser de 24 horas. Outros dados que foram obtidos durante a minha dissertação de mestrado (FERREIRA, 2019), utilizando outro agente genotóxico que direciona também para a mitocôndria mt-Cbl, mostrou, claramente, que os parasitas heminocautes de TcRad51 são sensíveis (Figura 34). O mt-Cbl é um composto alquilante que leva a formação de monoadutos, os quais podem levar à inibição da replicação do DNA, induzindo fortemente a formação de DSB (TABASI; AMANLOU; SIADAT; NOORMOHAMMADI *et al.*, 2013). Além disso, por causa de sua justaposição com outras bases no sulco maior do DNA, o mt-Cbl pode reagir com as bases de DNA, formando uma ligação cruzada entre o DNA (ICLs). Esse complexo de ligação cruzada de DNA é bastante estável e seu reparo requer fatores de várias de vias de reparo, como NER e reparo por recombinação homóloga, atraindo várias proteínas de ligação, provavelmente as proteínas BRCA1 e BRCA2, (ALEXEYEV; SHOKOLENKO; WILSON; LEDOUX, 2013) (Alexeyev, 2013).

Figura 34 — Resposta a lesões causadas por mt-Cbl em células TcRad51<sup>+/-</sup>



Na mesma dissertação, foi mostrado que as células heminocaute de TcRad51 são mais sensíveis ao agente genotóxico MMS, em concentrações mais elevadas, nos tempos de 10 horas e 24 horas, teoricamente quando o parasita entra na fase S/G2 o momento de ativação do reparo por recombinação homóloga (GELOT; LE-GUEN; RAGU; LOPEZ, 2016). Nosso grupo demonstrou anteriormente que o MMS leva à formação de DSBs no *T. cruzi* (SILVA, 2019). A quantificação das lesões no kDNA do *T. cruzi* permitiu identificar que especificamente as lesões ocasionadas por MMS no kDNA são alteradas nas células TcRad51<sup>+/-</sup> em comparação com as células WT, entre 6 a 24 horas após a exposição ao agente genotóxico (FERREIRA, 2019).

A fim de dar continuidade a esta investigação, decidimos analisar as diferenças nas respostas nuclear e mitocondrial frente às lesões ocasionadas pela doxorubicina. Para isso, utilizamos esse agente genotóxico sem o peptídeo de captação mitocondrial. Foi demonstrado que as células heminocaute para TcRad51 são mais sensíveis em comparação com as células WT (Figura 17B). No entanto, ao contrário do observado com mt-Dox, essas células não conseguem retomar seu crescimento, ou seja, a deficiência desse gene alterou a capacidade das células se reestabelecerem após o tratamento com este estressor, entrando em senescência. Contudo, não observamos diferenças em sua taxa de sobrevivência em relação às células WT em 1 hora e 24 horas (Figura 17D).

Curiosamente, pelos dados obtidos nas microscopias, a Dox também se acumula no kDNA, mas com o seu acúmulo também no núcleo, houve uma mudança no comportamento celular, apresentando evidências de sinalizações distintas vindas de cada compartimento celular, teoricamente com uma predominância do núcleo. Possivelmente, a parada no crescimento observada pela doxorubicina ocorre pela ativação de ATM. Já é bem descrito na literatura que esse agente leva à ativação da DDR e, conseqüentemente, à ativação das quinases ATR e ATM, que fosforilam as quinases de *checkpoint* Chk1 e Chk2, culminando na parada do ciclo celular (KCIUK; GIELECINSKA; MUJWAR; KOLAT *et al.*, 2023; TSANG; CHAU; KONG; FUNG; KWOK, 2003). Contudo, ainda não é bem estabelecido como ocorre a sinalização de danos ao DNA mitocondrial. O envolvimento da quinase ATM já foi descrito (JIN; CORDES, 2019), porém, ainda não é claro se esta proteína gera impactos diretos ou indiretos (SAKI; PRAKASH, 2017; SHIMURA, 2021).

Tratamos também as células heminocaute de TcRad51 com 300µM de cisplatina. Como descrito anteriormente, esse agente genotóxico pode levar à formação de DSB, assim como à formação de ligações cruzadas entre fitas, envolvendo várias vias de reparo, incluindo a recombinação homóloga (HUANG; LI, 2013). Os dados obtidos (Figura 18) mostraram que as

células WT e TcRad51<sup>+/-</sup> tem o crescimento interrompido até 24 horas após o tratamento. Contudo, após esse tempo, as células deficientes de TcRad51 começaram a perder a viabilidade celular. Para averiguar se essa morte estava relacionada às lesões no DNA, decidimos quantificar as lesões no nDNA e kDNA (Figura 19). Foi observado que no núcleo as células TcRad51<sup>+/-</sup> tiveram dificuldade em lidar com lesões geradas por cisplatina nos tempos de a 24 horas, enquanto as células WT tiveram as lesões reparadas, mostrando assim que a deficiência deste gene compromete o reparo de lesões causadas por cisplatina ao DNA nuclear nos tempos de 6 a 24 horas.

Avaliando as lesões mitocondriais geradas por cisplatina, mostrou-se que a depleção de TcRad51 inicialmente favoreceu o reparo (Figura 19B), pois 1 hora após o tratamento não havia detecção de lesões nos mutantes, enquanto ainda eram observadas lesões nas células WT. Isso mostra que TcRad51 não está envolvida no reparo rápido de lesões de cisplatina no kDNA. Além disso, a sua depleção facilitou o reparo, o que nos faz pensar que há uma certa competição na ligação ao DNA entre TcRad51 e outra enzima envolvida no reparo inicial. Contudo, 6 horas após o tratamento, o número de lesões aumentou e se manteve nas células heminocautas, enquanto não era mais possível detectar lesões nas células WT. Essas lesões possivelmente surgiram no processo de replicação, no qual houve a geração de DSBs, e a deficiência de TcRad51 comprometeu o reparo em relação ao WT. Acreditamos que a sensibilidade observada nas células heminocautas de TcRad51 seja devida ao comprometimento em lidar com as DSBs e ligações cruzadas gerados pela cisplatina, especialmente no núcleo.

Esse conjunto de resultados ajudam a evidenciar a presença de TcRad51 no reparo por recombinação homóloga na mitocôndria de *T. cruzi*. Evidências em *T. brucei* mostraram também que essa proteína é importante para promover a manutenção do genoma mitocondrial na presença de DSBs (VIEIRA-DA-ROCHA; PASSOS-SILVA; MENDES; ROCHA *et al.*, 2019), assim como em mitocôndrias de mamíferos (MISHRA; SAXENA; KAUSHAL; NAGARAJU, 2018; SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010). Mas vale salientar que nunca foi possível detectar a presença da TcRad51 na mitocôndria de *T. cruzi*, assim como de *T. brucei* (VIEIRA-DA-ROCHA; PASSOS-SILVA; MENDES; ROCHA *et al.*, 2019), ao contrário de células de humanos que já foi demonstrado o seu recrutamento perante condições de estresse (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010). Acreditamos que a sua localização mitocondrial não tenha sido possível devido a seu alto recrutamento no núcleo, assim, pela utilização dos agentes genotóxicos mitocondriais, acreditamos que o aumento dessa proteína seja específico na mitocôndria e, assim, seria possível colocalizar essa enzima na organela por técnicas de

imunofluorescência. Outro caminho seria a purificação da mitocôndria, porém, ainda é um protocolo muito difícil e que ainda não foi completamente padronizado, acredito que, provavelmente, devido ao seu tamanho e complexidade estrutural, pois o disco kDNA está ligado ao corpo basal e probasal pelo TAC na forma epimastigota (JENSEN; ENGLUND, 2012).

Considerando as evidências apresentadas até o momento sobre a participação de TcRad51, decidimos investigar se o reparo por recombinação homóloga mitocondrial é canônico igual o núcleo, para isso decidimos investigar se as junções de *holliday* também são processadas na mitocôndria, com o envolvimento da topoisomerase 3 $\alpha$ . Essa enzima desempenha um papel crucial em lidar com lesões na dupla fita de DNA causadas pelos agentes genotóxicos MMS, radiação gama e hidroxireia no *T. cruzi* (COSTA-SILVA; RESENDE; UMAKI; PRADO *et al.*, 2021). Além disso, a atuação da topoisomerase 3 $\alpha$  nas mitocôndrias humanas e de *Drosophila melanogaster* já foi descrita (TSAI; LIN; HSIEH, 2016).

Foram geradas lesões mitocondriais com a utilização de mt-Dox em células nocautes de topoisomerase 3 $\alpha$  (tcTopo3 $\alpha$ <sup>KO</sup>) (Figura 20A) e observou-se que as células mutantes foram sensíveis até 24 horas, retomando o seu crescimento em 48 horas. Como um dos principais mecanismos de ação da doxorubicina é a inibição de topoisomerasas (KCIUK; GIELECINSKA; MUJWAR; KOLAT *et al.*, 2023), decidimos utilizar outra linhagem nocaute para uma topoisomerase, a topoisomerase 3 $\beta$  (TcTopo3  $\beta$  Ko). Pela utilização do mesmo tratamento, não foi observada sensibilidade (Figura 20C); essas células tiveram um comportamento semelhante às células WT. A topoisomerase 3 $\beta$  é descrita na regulação da formação de R-loops durante a transcrição e se associa a mRNAs, regulando sua tradução, trabalhando com outras proteínas ligadoras de RNA (RBPs) (AHMAD; SHEN; LI; XUE *et al.*, 2017; POMMIER; SUN; HUANG; NITISS, 2016). Contudo, sua função em *T. cruzi* ainda não está clara.

Durante os estudos de recombinação observamos que existe um reparo rápido, principalmente com o tratamento com cisplatina, onde observamos que a ausência de TcRad51 melhorou esse reparo, nos questionamos se isso seria um reparo acoplado ao processo transcricional. As evidências de um reparo acoplado ao processo transcricional na mitocôndria em *T. cruzi* surgiram inicialmente em 2011 em nosso grupo, por meio de um trabalho que demonstrou uma cinética de reparo rápida no kDNA em resposta à cisplatina e radiação ultravioleta do tipo C (RAJAO, 2011). Ambos os agentes genotóxicos causam a formação de lesões volumosas que resultam na parada do processo de transcrição, classicamente reparadas

pelo NER (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; PASCUCCI; VERSTEEGH; VAN HOFFEN; VAN ZEELAND *et al.*, 1997). Além disso, alguns estudos sobre o efeito da cisplatina nas mitocôndrias indicaram que esse agente genotóxico bloqueia a transcrição e replicação do mtDNA, marcando-as para degradação seletiva (LARSEN; RASMUSSEN; RASMUSSEN, 2005). Acreditamos que os tripanossomatídeos não conseguem realizar esse processo devido à presença de sua única mitocôndria. As mitocôndrias desses organismos, assim como as de outros, realizam a transcrição de maneira policistrônica (FEAGIN; JASMER; STUART, 1985; READ; MYLER; STUART, 1992). No entanto, como mencionado anteriormente, alguns genes requerem “correções” que são realizadas por um sistema de edição de RNA codificado pelos minicírculos (BENNE, 1989; LIU; WANG; LI; ZHANG *et al.*, 2023). Ou seja, a tradução correta da maioria das proteínas mitocondriais dos tripanossomatídeos depende de duas transcrições independentes. Com base nesses conhecimentos, nos questionamos como esse organismo lida com lesões que interrompem o processo transcricional.

Em busca de investigar mais evidências de um reparo acoplado ao processo transcricional, realizamos experimentos em células heminocaute (TcCSB<sup>+/-</sup>) e superexpressoras de TcCSB (TcCSB<sup>+</sup>) porque, como já mencionado, é uma enzima de reparo essencial na via TC-NER. Essa via consiste em reconhecer a RNA polimerase parada e retirá-la do local da lesão. Como a doxorrubicina também interrompe o processo de transcrição (KCIUK; GIELECINSKA; MUJWAR; KOLAT *et al.*, 2023), o direcionador presente na mt-Dox permitiria observar o efeito da parada da RNA polimerase durante a transcrição exclusivamente do kDNA.

Os resultados após o tratamento com mt-Dox mostraram que as células TcCSB<sup>+/-</sup> foram mais sensíveis 1 hora após o tratamento em relação às células WT e superexpressoras de TcCSB (Figura 21C). Enquanto as células heminocaute conseguiram retomar o crescimento 24 horas após o tratamento, (Figura 21A) as células TcCSB<sup>+</sup>, apesar de serem mais resistentes em uma hora, não conseguiram retomar seu crescimento 24 horas após o tratamento (Figura 21B e C). Acreditamos que as células superexpressoras foram mais resistentes inicialmente devido ao rápido reconhecimento de RNA polimerases paradas, sinalizando para o sistema de reparo iniciar o processo. O retorno ao crescimento foi tardio, provavelmente devido ao excesso de sinalização. No entanto, ainda não compreendemos quais são os fatores dessa sinalização mitocondrial que ocorre com lesões geradas por mt-Dox.

Decidimos, então, avaliar a resposta nuclear utilizando a doxorrubicina. Curiosamente, obtivemos o resultado inverso: as células TcCSB<sup>+</sup> foram mais sensíveis 1 hora após o

tratamento (Figura 22C), seguido por uma recuperação e parada no crescimento em 24 horas (Figura 22B). Enquanto as células TcCSB<sup>+/-</sup> foram mais resistentes, semelhantes às células WT, mas não retomaram bem o crescimento (Figura 22A e C). A sensibilidade das células TcCSB<sup>+</sup>, provavelmente e inicialmente, se deve ao excesso de sinalização mediada por ATR, desencadeada pela presença de mais RNA polimerases paradas diante das lesões geradas pela Dox. Diferentemente da mitocôndria, o genoma nuclear é maior em extensão e conseqüentemente, na presença de lesões bloqueadoras da transcrição, há um maior número de sítios de ligação para CSB em relação ao kDNA, de modo que a sinalização deve ser mais intensa. Acreditamos que a morte e a parada no ciclo celular em ambas as linhagens são inicialmente mediadas por ATR, de acordo com o que foi demonstrado em células humanas, ATR bloqueia a fase G2/M induzida pelos adultos de Dox. Inclusive, a inibição de ATR em células tratadas com esse agente genotóxico levou à perda da sinalização de parada do ciclo celular, gerando defeitos no fuso mitótico (FORREST; SWIFT; REPHAELI; NUDELMAN *et al.*, 2012; GHELLI LUSERNA DI RORA; GHETTI; LEDDA; FERRARI *et al.*, 2023). A longo prazo, essa parada possivelmente é mantida por ATM (BATEY; ZHAO; KYLE; RICHARDSON *et al.*, 2013). Ou seja, quando as lesões são nucleares tendem a parar o crescimento das células, enquanto as lesões são direcionadas, exclusivamente, para as mitocôndrias, é possível observar uma morte celular rápida, e, mesmo com a Dox sendo um agente genotóxico que leva a lesões nos dois compartimentos no caso do *T. cruzi* como observado na microscopia, não foi possível observar uma ação sinérgica e, aparentemente, uma resposta dominante do núcleo. Para comprovar completamente essa hipótese, ainda será necessário realizar uma quantificação de danos com Dox no núcleo e mitocôndria do *T. cruzi*.

Como observamos perfis de sinalização diferentes entre Dox e mt-Dox, decidimos investigar se a morte celular sinalizada pela mitocôndria gerada por mt-Dox nas células TcCSB<sup>+/-</sup> também é sinalizada por quinases como ATR e ATM. Devido à limitação na quantidade de droga fornecida, optamos, inicialmente, por realizar apenas com o inibidor de cafeína (inibidor inespecífico de ATM/ATR). Os resultados (Figura 23) indicaram um resgate de sobrevivência dessas células, sugerindo apesar da sinalização diferente do núcleo, a morte celular sinalizada pelos danos ao kDNA, possivelmente, envolve essas quinases ou quinases similares que podem ser inibidas por cafeína. No entanto, mais estudos são necessários para compreender esse processo de sinalização. Inclusive, pretendemos, em breve, utilizar inibidores específicos para cada uma dessas quinases.

Em busca de agentes genotóxicos que levam à ativação do TC-NER para investigar esse possível reparo transcricional mitocondrial, decidimos utilizar a radiação UV-C, conhecida classicamente por induzir principalmente a formação de CPD (70-80% das lesões) e 6-4PP (20 a 30% das lesões), causando distorções nas hélices da molécula de DNA (HANAWALT; SPIVAK, 2009). As células TcCSB<sup>+/-</sup> e TcCSB<sup>+</sup> foram expostas a 1500  $\mu\text{J}/\text{m}^2$ . A cepa superexpressora mostrou-se muito mais sensível 1 hora após o tratamento, atingindo uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 40% enquanto essa taxa foi de 65% para células WT (Figura 24 C), resultado semelhante ao obtido por Mendes (2015) com 750  $\mu\text{J}/\text{m}^2$  em PBS. No entanto, essas células sobreviventes voltaram a crescer após 24 horas do tratamento. Esses resultados sugerem que, após o tratamento, a cepa TcCSB<sup>+</sup> pode estar reconhecendo mais RNA polimerase paradas frente a uma lesão causada por UV-C. Esse excesso de sinalização poderia, então, estar levando essas células à morte. Contudo, com a deficiência de CSB, as células não conseguem reparar eficientemente as lesões, o que pode resultar em problemas posteriores durante a replicação do seu material genético (MENDES, 2015). Essa hipótese assemelha-se muito aos dados obtidos com Dox. Já é bem descrito na literatura que a presença de lesões no DNA induzidas por UV leva à ativação de ATR, sendo ativada pelas lesões no DNA; conseqüentemente, se não reparadas, levam à formação de DSB e ativação de ATM (GARTNER; MILSTEIN; AHMED; HODGKIN; HENGARTNER, 2000; STERGIUO; DOUKOUMETZIDIS; SENDOEL; HENGARTNER, 2007). Dados obtidos em *T. cruzi* também mostraram que a inibição da via ATM/ATR foi capaz de evitar a morte dos parasitas TcCSB<sup>+</sup> quando expostos a 750  $\text{J}/\text{m}^2$  de UV-C (MENDES, 2015). Acreditamos que o mesmo ocorra com 1500  $\text{J}/\text{m}^2$  de UV-C.

Essa resposta de morte celular pode ser predominantemente induzida por uma resposta nuclear, contudo decidimos investigar o papel das lesões no DNA nesse processo. Para isso, avaliamos as cinéticas de reparo do DNA nuclear e mitocondrial após o desafio com 1500  $\text{J}/\text{m}^2$  de UV-C. Ao observar as células WT, notamos que a maioria das lesões geradas por UV-C não foram reparadas no núcleo (Figura 25A); no entanto, houve um reparo parcial no kDNA (Figura 25B), reproduzindo o resultado obtido anteriormente por nosso grupo (RAJAO, 2011)

Ao avaliar as células TcCSB<sup>+</sup>, observamos que, diferentemente das células WT, um reparo mais eficiente está ocorrendo no núcleo (Figura 25A); no entanto, não foi possível detectar lesões ao kDNA nesse mutante (Figura 25B). Não houve reparo de lesões nas células TcCSB<sup>+/-</sup> no núcleo nem no kDNA de modo que é possível inferir que a ausência de CSB impacta o reparo do kDNA nestas condições (Figura 25B).

Esses resultados indicam que a mitocôndria tem uma maior sensibilidade para lesões causadas por UV-C em comparação com o núcleo. É possível hipotetizar que, no núcleo, essa tolerância a lesões ocorre devido à síntese translesão no processo de replicação e transcrição. Esse processo foi descrito, inicialmente, na replicação em leveduras, mostrando que os dímeros de CPD, responsáveis por cerca de 80% das lesões geradas por UV-C, podem ser contornados pelo processo de síntese translesão pela DNA polimerase  $\eta$  (Pol  $\eta$ ), sendo preciso e eficiente, sem cometer erros (JOHNSON; PRAKASH; PRAKASH, 2006; SINHA; HÄDER, 2002). Esse mecanismo também foi demonstrado em células humanas (LERNER; FRANCISCO; SOLTYS; ROCHA *et al.*, 2017). Estudos realizados em *T. cruzi* mostraram que a Pol  $\eta$  é capaz de contornar lesões por UV-C, embora sua superexpressão não confira proteção contra a luz UV-C (DE MOURA; SCHAMBER-REIS; PASSOS SILVA; RAJAO *et al.*, 2009). Ainda não existem evidências claras do envolvimento da Pol  $\eta$  nas mitocôndrias de mamíferos, porém existem resultados em levedura que mostram a colocalização mitocondrial da Pol  $\eta$  e um fenótipo de maior sensibilidade ao mtDNA após a exposição a UV-C (CHATERJEE *et al.*, 2013). No entanto, pode haver outras DNA polimerases desempenhando um papel semelhante que ainda não foram caracterizadas, como as DNA polimerases zeta (Rev3) e a DNA primase polimerase (PrimPol) (KOZHUKHAR; SPADAFORA; FAYZULIN; SHOKOLENKO; ALEXEYEV, 2016; KRASICH; COPELAND, 2017). Além da replicação, o processo de síntese translesão também ocorre na transcrição, se mostrando extremamente importante justamente pela maior parte do genoma ser continuamente transcrito (AGAPOV; OLINA; KULBACHINSKIY, 2022). Já foi mostrado inclusive que o CSB, se liga e pode estimular a translocação direta da RNA polimerase II, formando um complexo alternativo de alongamento chamado EC<sup>TCR</sup>, se o obstáculo puder ser ultrapassado a transcrição continua, caso não se inicie o TC-NER como as lesões de CPD alteram questões estruturais e não do pareamento a informação génica não é perdida. (CHARLET-BERGUERAND; FEUERHAHN; KONG; ZISERMAN *et al.*, 2006; KOKIC; WAGNER; CHERNEV; URLAUB; CRAMER, 2021; XU; LAHIRI; WANG; WIER *et al.*, 2017).

Os dados apresentados indicam o envolvimento de CSB em lidar com essas lesões no kDNA, e a sua depleção levou a complicações no reparo dessas lesões.

Como último agente genotóxico, decidimos utilizar a cisplatina, que induz a formação de adutos capazes de causar grandes distorções na dupla-hélice do DNA, levando à interrupção da transcrição (SIDDIK, 2003; WANG; LIPPARD, 2005). Essas distorções são reparadas primariamente pelo NER.

Os dados obtidos revelaram que as células TcCSB<sup>+</sup> foram mais resistentes do que as células WT (Figura 26B), enquanto as células TcCSB<sup>+/-</sup> apresentaram maior sensibilidade em resposta ao tratamento com 300µM de cisplatina (Figura 26A e C). Um fenótipo semelhante foi observado por Mendes (MENDES, 2015) com 75µM de cisplatina. Ao contrário do que foi observado com UV e Dox, as células TcCSB<sup>+</sup> demonstraram maior resistência. A hipótese que sugerimos é que, devido ao fato de as lesões geradas pela cisplatina serem capazes de bloquear de maneira mais significativa a passagem da RNA Pol II (DAMSMA; ALT; BRUECKNER; CARELL; CRAMER, 2007), em comparação com os dímeros CPD, por exemplo, essas lesões precisam ser removidas pelo TC-NER no núcleo. Caso contrário, a transcrição seria interrompida novamente. Dada a natureza da transcrição policistrônica do *T. cruzi*, a acumulação de lesões poderia parar a transcrição, levando as células à morte. Nos questionamos se nesse organismo o reparo de lesões causadas por cisplatina estaria envolvido na morte observada nas células TcCSB<sup>+/-</sup>.

Para responder a essa pergunta e entender a resposta mitocondrial diante desse tipo de lesão, realizamos a quantificação de lesões utilizando a técnica de qPCR de longa extensão. Tratamos as células WT, TcCSB<sup>+</sup>, e TcCSB<sup>+/-</sup> com 300µM de cisplatina. Observamos que as células WT apresentam um reparo rápido tanto no núcleo quanto na mitocôndria 1 hora após o tratamento (Figura 27 A e B). Além disso, notamos que o reparo dessas lesões ocorrem de maneira mais eficiente no kDNA do que no DNA nuclear, de modo que não é possível detectar lesões no kDNA 6 horas após o tratamento (Figura 27B), resultados semelhantes foram obtidos anteriormente pelo nosso grupo (RAJAO, 2011) e também em *T. brucei* (VIEIRA-DA-ROCHA; PASSOS-SILVA; MENDES; ROCHA *et al.*, 2019).

Ao analisar a cinética de reparo das células TcCSB<sup>+</sup>, observamos que tanto no núcleo quanto na mitocôndria todas as lesões são reparadas até 1 hora após o tratamento (Figura 27 A e B). Entretanto, nas células TcCSB<sup>+/-</sup>, a cinética de reparo é mais lenta no núcleo e na mitocôndria o número de lesões diminui significativamente até seis horas após o tratamento, e aumentando entre 6 e 24 horas após o tratamento, o que pode ser devido à formação de quebras de fita dupla, geradas pela parada da replicação do DNA (Figura 27 A e B). Esses dados apoiam a hipótese de que as células TcCSB<sup>+/-</sup> são mais sensíveis precisamente por não conseguirem lidar eficientemente com as lesões, tanto no núcleo quanto na mitocôndria, e devida a natureza policistrônica da transcrição, há uma alteração em sua expressão gênica e conseqüentemente leva à morte celular do parasita. É interessante observar que a maior formação de quebras de fita dupla no kDNA da linhagem heminocaute após o tratamento com cisplatina, evidenciada

pelo aumento do número de lesões bloqueadoras detectadas pela qPCR, pode ser uma consequência de uma menor atividade de síntese translesão durante a replicação do kDNA, o que seria condizente com os dados obtidos após o tratamento com UV-C, indicando que não deve haver tolerância eficiente de lesões causadas por estes estressores, que seriam toleradas pela DNA polimerase  $\eta$  (RAJAO, 2011). Outra hipótese que temos é que a presença de RNA polimerases podem de alguma forma inibir a recombinação homologa no kDNA, como as células TcCSB<sup>+/-</sup> acabaria por ter uma transcrição menor devido ao baixo reconhecimento das RNA polimerases paradas, conseqüentemente levaria a uma menor ativação da recombinação homologa, já tem trabalhos que mostram que as regiões que são mais transcritas levam a uma melhor ativação do reparo por recombinação homologa (OUYANG; YADAV; ZHANG; YANG *et al.*, 2021).

Estudos em células humanas indicam que a aceleração do reparo de DNA é um dos mecanismos de resistência ao tratamento com cisplatina (KARTALOU; ESSIGMANN, 2001). Além disso, evidências mostram que a ATR é um importante modulador na resposta à cisplatina, e o uso de inibidores dessa quinase aumenta em até 10 vezes a sensibilidade à cisplatina (HALL; NEWSOME; WANG; BOUCHER *et al.*, 2014; VENDETTI; LAU; SCHAMUS; CONRADS *et al.*, 2015). Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa indicam que as células superexpressoras de TcCSB apresentam um alto nível de ATR (Júnior, 2023 *no prelo*), o que poderia, de alguma forma, levar a uma ativação mais efetiva da DDR, parada do ciclo celular e reparo para esse tipo de lesão.

Poucos estudos abordam o dano ao mtDNA causado pela cisplatina, mas alguns trabalhos já indicam que as mutações no mtDNA podem ser mais comuns do que as encontradas no nDNA (MURATA; HIBASAMI; MAEKAWA; TAGAWA; NAKASHIMA, 1990; OLIVERO; SEMINO; KASSIM; LOPEZ-LARRAZA; POIRIER, 1995). A exposição à cisplatina em células humanas já foi associada à translocação de p53 para as mitocôndrias, assim como ao aumento do fator de transcrição mitocondrial ao DNA danificado (YANG; SCHUMAKER; EGORIN; ZUHOWSKI *et al.*, 2006; YOSHIDA; IZUMI; TORIGOE; ISHIGUCHI *et al.*, 2003). Apesar das mitocôndrias de eucariotos não apresentarem, até o momento, uma via de reparo acoplado ao processo transcricional para lesões volumosas, seria lógico pensar que a presença de uma via dessas seria de extrema importância para o cinetoplastida devido às características únicas de suas mitocôndrias. Coletamos evidências nessa tese que sugerem fortemente a presença dessa via no *T. cruzi*, assim como foi apresentada

que o *T. brucei* (VIEIRA-DA-ROCHA; PASSOS-SILVA; MENDES; ROCHA *et al.*, 2019) é capaz de reparar lesões volumosas nas mitocôndrias.

Para investigar se de fato TcCSB realmente está envolvido no reparo acoplado ao processo de transcrição e não em outra via de reparo mitocondrial, esperaríamos que o número de transcritos sofresse alteração após um estresse que levasse à parada da transcrição nos mutantes em relação às células WT. Para responder a essa pergunta, decidimos avaliar o número de transcritos dos genes mitocondriais: Subunidade 2 do citocromo C oxidase (COXII), subunidade 6 da ATP Sintase (ATP6e - transcrito editado, e ATP6p - transcrito não editado), subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7).

Primeiramente, medimos o número de transcritos basais nesses mutantes para verificar se a superexpressão ou diminuição de TcCSB alteraria o processo transcripcional mitocondrial (Figura 28). Foi possível observar que não há diferenças estatísticas entre os transcritos ATPe, ATP6p e COXII. Contudo, o transcrito do gene ND7, apresentou ter aproximadamente 300% mais transcritos apenas nas células TcCSB<sup>+</sup>. As células então foram então tratadas com 300µM de cisplatina, e o número de transcritos foi avaliado imediatamente após o tratamento (0h), 1 hora e 6 horas após a exposição ao agente genotóxico. Obtivemos os seguintes resultados para os transcritos de COXII, ATP6 (pré-mRNA (ATP6p) e mRNA (ATP6e) (Figura 29): houve uma queda significativa no número de transcritos nas células TcCSB<sup>+/-</sup> nos tempos 0h e 1h, mantendo-se baixo para os transcritos de ATP6e e COXII até 6 horas após o tratamento. Não foram observadas diferenças estatísticas 6 horas após no ATP6p em comparação com as células TcCSB<sup>+</sup> e WT. Essa diminuição do número de transcritos provavelmente é devida às lesões no kDNA, que foram evidenciadas por qPCR (Figura 27B), indicando que as lesões de cisplatina permanecem no kDNA e, conseqüentemente, interferem no processo de transcrição mitocondrial. Esses resultados sugerem que a deficiência de TcCSB diminui o número de transcritos desses genes em comparação com as células WT e TcCSB<sup>+</sup>, devido à presença de lesões volumosas que levam à parada do processo de transcrição.

Utilizamos dois alvos para o gene ATP6 devido ao seu complexo sistema de edição, assim, seria possível avaliar o efeito das lesões nos maxicírculos pela quantificação dos transcritos do pré-mRNA e se essas lesões alterariam o processo de edição guiado pelos gRNAs, codificados pelos minicírculos. Esse transcrito é extremamente curioso, pois toda a sua região transcrita é editada por um mecanismo altamente conservado tanto em *T. cruzi* quanto em *T. brucei* (KOSLOWSKY; BHAT; PERROLLAZ; FEAGIN; STUART, 1990; OCHS; OTSUB; TEIXEIRAB; MOSER; KIRCHHOFF, 1996). Em *T. cruzi*, a região codificadora desse gene

codifica um pré-transcrito de 393 nt, enquanto o mRNA maduro resultante possui 684 nt. Isso significa que, no processo de edição, 57% de sua sequência é modificada pela inserção de uridinas, além da excessiva adição de uridinas, também é descrito que 34 uridinas que são codificadas pelo gene são removidas no transcrito final (OCHS; OTSUB; TEIXEIRAB; MOSER; KIRCHHOFF, 1996). Esse processo é conhecido como *pan-edited*, onde 50% ou mais de sua sequência é editada no pré-mRNA para o mRNA maduro. Como descrito anteriormente, as células TcCSB<sup>+/-</sup> tiveram uma queda significativa em ambos. No entanto, foi observado que 6 horas após o tratamento, houve um aumento do pré-mRNA, mas não foi observado esse aumento no mRNA maduro. Esse mesmo aumento foi mostrado nas células WT e TcCSB<sup>+</sup>, no transcrito primário. Contudo, apenas as células TcCSB<sup>+</sup> apresentaram um aumento do mRNA maduro. Podemos hipotetizar que, de alguma forma, o reparo mais eficiente nas células TcCSB<sup>+</sup> podem ter levado à disponibilização de mais guias e, conseqüentemente, a um processo de edição mais eficiente.

Da mesma forma, decidimos avaliar um gene que não necessitaria de transcritos dos minicírculos para produzir um transcrito funcional, mas que passe por um processo de edição. Para isso, escolhemos o gene da subunidade II do citocromo oxidase (COXII). Esse transcrito tem quatro uridinas inseridas no mRNA final, inclusive nas mesmas posições encontradas em *T. brucei*, *L. tarentolae* e *Crithidia fasciculata*. Essas edições não precisam de gRNAs codificados pelo minicírculo, pois passa pelo processo de edição em CIS, ou seja, o gRNA que serve como modelo para as quatro inserções de uridina está localizado na região 3' não traduzida do próprio mRNA de COII (KIM; TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1994). Os resultados com esses transcritos (Figura 29 D), mostraram que, assim como para ATP6, nas células TcCSB<sup>+</sup> houve um reparo mais eficiente no kDNA, de modo que o número de transcritos foi recuperado mais rapidamente, assim como a deficiência de TcCSB apresentou mais lesões no kDNA (Figura 27B) e logo teve uma queda associada aos números de transcritos.

O último transcrito avaliado foi o do gene ND7. Diferentemente dos outros, o número de transcritos nas células TcCSB<sup>+/-</sup> foi maior que nas células TcCSB<sup>+</sup> nos tempos 0h e 6h após o tratamento, inclusive sendo maior que nas células WT, 6 horas após o tratamento. O gene ND7 codifica uma subunidade do complexo I da cadeia respiratória. O complexo I é uma grande estrutura multimolecular contendo mais de 40 subunidades em mamíferos e plantas (HEAZLEWOOD; HOWELL; MILLAR, 2003). Devido à sequência deduzida do maxicírculo do ND7 dos tripanossomas (KOSLOWSKY; BHAT; PERROLLAZ; FEAGIN; STUART, 1990), sugere-se que a subunidade ND7 do *T. cruzi* esteja envolvida diretamente na oxidação

do NADH (BAPTISTA; VÊNICO; ABDALA; CARRANZA *et al.*, 2006). Logo, com uma disfunção no complexo I seria esperada uma alteração no metabolismo desse organismo. Contudo, não é o que acontece, pois curiosamente algumas cepas de *T. cruzi* contêm um RNA truncado de ND7, mas apresentam crescimento normal em meio LIT e infectam hospedeiros mamíferos como as demais cepas. Inclusive, esse fato levou a uma discussão se o complexo I realmente é funcional em *T. cruzi*, assim como em outros tripanosomatídeos (BAPTISTA; VÊNICO; ABDALA; CARRANZA *et al.*, 2006). A conservação das deleções dos genes ND7 em algumas cepas podem vim de processo de hibridização, é improvável que essa deleção mitocondrial idêntica tenha ocorrido independentemente várias vezes (CARRANZA; VALADARES; D'ÁVILA; BAPTISTA *et al.*, 2009).

ND7 também é um gene pan-editado em *T. cruzi* e *T. brucei*, e seu transcrito requer uma extensa edição de RNA, com duas grandes regiões de edição separadas por uma região não editada de aproximadamente 70 pb. O padrão preciso de edição em *T. cruzi* ainda não foi determinado, mas o bloco não editado de 70 pb é conservado entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* (BAPTISTA; VÊNICO; ABDALA; CARRANZA *et al.*, 2006; KOSLOWSKY; BHAT; PERROLLAZ; FEAGIN; STUART, 1990). Os resultados obtidos para o transcrito de ND7 foram apenas para o pré-mRNA e não para o mRNA maduro. De alguma forma em condições basais esse pré-mRNA está muito elevado nas células superexpressora de TcCSB o que poderia acabar mascarando um efeito em condições de estresse por já está muito elevado naturalmente em comparação com as células WT e TcCSB<sup>+/-</sup>. Além disso, por estar localizado em uma região de troca de fita no processo transcricional (Figura 6A), o excesso de CSB de alguma forma está mudando a regulação desse transcrito, portando é possível hipotetizar que possivelmente é uma região de instabilidade gênica, que pode ser estabilizada por CSB. Talvez por ser uma região comum de colapso de forquilhas de replicação e transcrição, o excesso de CSB pode estar retirando mais rapidamente as RNA polimerases paradas, estabilizando a região, Mas ainda não podemos afirmar se esses transcritos serão editados e liberados para o processo de transcrição. Mais estudos são necessários, assim como realizar uma quantificação do transcrito maduro desse gene.

De forma geral, os dados apresentados nos mostraram que TcCSB está envolvido no reparo acoplado ao processo transcricional na mitocôndria de *T. cruzi*. Seus mutantes apresentaram alterações na sobrevivência, reparo e transcrição desse parasito. Inclusive, é possível observar que existe um estímulo transcricional mitocondrial após o processo de reparo, que também já tinha sido observado com radiação ionizante (GRYNBERG; PASSOS-SILVA; MOURÃO;

HIRATA JR *et al.*, 2012).

Por fim, decidimos investigar se uma proteína específica do cinetoplasto de tripanossomatídeos poderia estar envolvida no reparo de DNA acoplado ao processo de transcrição nessa organela. Como descrito anteriormente, proteínas associadas ao cinetoplasto são exclusivas desses organismos e estão envolvidas com diversas funções relacionadas ao kDNA. O grupo vem há algum tempo tentando determinar a função de uma dessas proteínas (TcKAP7). A proteína TcKAP7 tem revelado um importante papel na mitocôndria de *T. cruzi*, onde coletamos evidências de seu envolvimento em resposta à lesões que levam à distorção da dupla fita do kDNA, principalmente nas horas iniciais (REPOLÊS, 2019)

Para podermos entender melhor o seu papel frente a essas lesões, decidimos avaliar o seu fenótipo por meio de tratamento com a droga mitocondrial mt-Dox e Dox. Para isso, tratamos as células WT e células nocautes para TcKap7 (TcKap<sup>KO</sup>) com 16  $\mu$ M de mt-Dox e Dox (Figura 30). Não obtivemos diferenças entre a TcKap<sup>KO</sup> e WT com o tratamento com Dox 1 hora após o tratamento, devido à resposta celular de Dox ser inicialmente oriunda do núcleo, como já discutido anteriormente. Contudo foi observado que as células TcKap<sup>KO</sup>, tiveram uma parada 24 horas, possivelmente devido à presença desse agente genotóxico nas mitocôndrias. Não observamos um efeito sinérgico e, sim, possivelmente, uma escolha de ativação, sendo uma ativação nuclear seguida de uma ativação mitocondrial. Os resultados obtidos com a mt-Dox (Figura 30 B) mostraram que as células TcKap7<sup>KO</sup> foram sensíveis na primeira hora após o tratamento, tendo uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 50% (Figura 30D). Contudo, após esse primeiro momento, as células nocautes retomaram o seu crescimento normalmente. Isso mais uma vez mostrou que o envolvimento de TcKap7 é apenas no momento inicial do surgimento das lesões, quando as lesões são apenas nas mitocôndrias.

Estudos anteriores demonstraram que a falta de TcKap7 é capaz de aumentar a sensibilidade a agentes genotóxicos que levam à parada do processo de transcrição, como a radiação ultravioleta e a cisplatina. Inclusive, esses dados também foram obtidos em outro tripanossomatídeo, o organismo *Angomonas deanei*. Em ambos os organismos, a ausência de KAP7 levou a um aumento na sensibilidade a longo prazo após tratamentos com cisplatina e radiação UV, indicando uma via de resposta associada com a transcrição no kDNA desses parasitos (REPOLÊS, 2019). Contudo, a ausência dessa enzima em *T. cruzi* não inibiu o processo de reparo para essas lesões mencionadas e sim atrasou o processo de reparo. Esse atraso de recrutamento pode explicar porque essas células, quando tratadas com Dox, demoram

em retornar o seu crescimento em comparação as células WT, pois, como foi mostrado, esse agente genotóxico, diferente de outros eucariotos se apresenta na mitocôndria do *T. cruzi*. Com essas evidências, hipotetizamos que de alguma forma essa enzima possa estar envolvida no processo de recrutamento e regulação do reparo acoplado ao processo de transcrição.

Devido essas evidências, decidimos avaliar também se o nocaute dessa proteína levaria à alteração dos transcritos mitocondriais diante de lesões que levam à parada do processo de transcrição na mitocôndria. Sendo assim avaliamos os mesmos genes que foram utilizados anteriormente para TcCSB, sendo eles: Subunidade 2 do citocromo C oxidase (COII), subunidade 6 da ATP Sintase (ATP6e (transcrito editado) e ATP6p (transcrito não editado)), subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7). Primeiramente, medimos o número de transcritos basais desse mutante, a fim de verificar se o nocaute alteraria o processo transcricional mitocondrial. Foi possível observar que, basalmente, não houve diferenças para o transcrito ATP6e. No entanto, registramos diferenças estatísticas para o gene COII, na qual as células TcKap7<sup>KO</sup> tiveram uma menor quantidade desse transcrito. Apesar de não haver uma diferença estatística observada, notamos uma tendência de haver mais transcritos de ATP6p e ND7, indicando que o nocaute de TcKap7, possivelmente, leva a um descontrole transcricional mitocondrial basal nesses células.

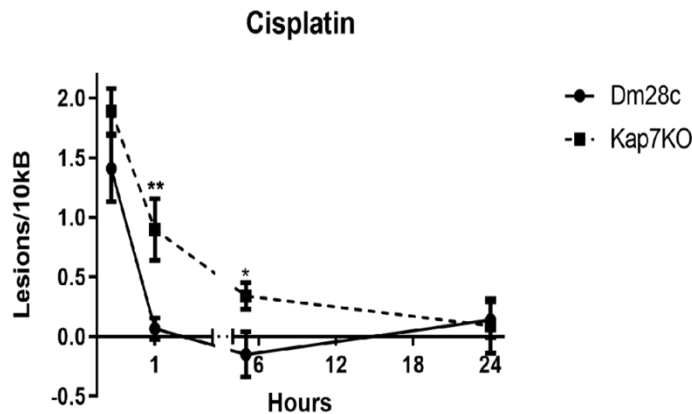
Foi utilizado também a cisplatina, para avaliar se haveria alteração transcricional nos nocaute de TcKap7, resultados anteriores (REPOLÊS, 2019), repedidos (Figura 31) mostraram que essa proteína é sensível ao tratamento com cisplatina, com uma porcentagem de sobrevivência da célula mutante de aproximadamente 50%

As células nocautes para TcKap7 (TcKap7<sup>KO</sup>) e as selvagens foram expostas a 300  $\mu$ M de cisplatina. Os números dos transcritos ATP6e, ATP6p, COII e ND7 foram avaliados. Os números de transcritos para ND7 apresentaram diferenças estatísticas apenas 5 horas após o tratamento, onde os números de transcritos desse gene estavam maiores nas cepas nocautes. Quando avaliamos o número de transcritos para COII, as células TcKap7<sup>KO</sup> apresentaram um maior número de transcritos logo após o tratamento, assim como 5 horas após o tratamento. Não foram observadas diferenças no pré-mRNA da ATP6; no entanto, o mRNA maduro de ATP6 apresentou um número de transcritos maior nas células mutantes de TcKap7 logo após o tratamento e uma queda no número de transcritos 5 horas após o tratamento.

Esses resultados indicam que o nocaute de TcKap7 parece resultar, principalmente, em um aumento dos transcritos mais tardiamente após o estresse genotóxico. As lesões geradas por cisplatina diminuem consideravelmente até uma hora após o tratamento; no entanto, o reparo é

mais lento no mutante que nas células WT (Figura 35). Isso nos levaria a pensar que o número de transcritos nas células nocautes de TcKap7 seria menor do que nas células WT, mas não foi isso que encontramos. Contudo, apesar de não observamos uma diferença estatística podemos observar que as células TcKap7<sup>KO</sup> têm uma tendência a manter o número de transcritos logo após o tratamento e cair 1 hora após o tratamento, enquanto as células WT fazem o movimento contrário, o que nos leva a pensar que o atraso do processo de reparo leva a uma parada transcricional mais tardia, e de alguma forma, diferentemente de TcCSB, que está diretamente envolvida no reparo, TcKap7 pode estar envolvida na DDR mitocondrial em lesões que levam à parada do processo transcricional. Sua deficiência nos apresentou a possibilidade de estar ocorrendo um atraso na regulação da transcrição mitocondrial que não ocorre nas células WT.

Figura 35 — Cinética de reparo mitocondrial de TcKap7<sup>ko</sup> com cisplatina



Legenda: Cinética de reparo mitocondrial de células DM28c (WT) em linha preta contínua e Células TcKap7<sup>KO</sup> em linhas pretas tracejadas, tratadas com 300  $\mu$ M de cisplatina

Fonte: Repoles, 2019.

Dados do nosso grupo mostraram que a ausência de TcKap7 alterou o perfil de morte celular em *T. cruzi* após o tratamento com UV-C. Enquanto as células WT expostas a 1500  $\mu$ J/m<sup>2</sup> morrem por uma sinalização que marcaria a apoptose, as células TcKap7<sup>KO</sup> morrem por sinalização sem a exposição de fosfatidilserina, apresentando os mesmos marcadores para necrose (ASSIS, 2019; REPOLÊS, 2019). Isso mostra que a ausência dessa proteína nas mitocôndrias levou a uma alteração na resposta ao dano ao UV-C. Acreditamos fortemente, que esse perfil de morte foi resultado de uma sinalização mitocondrial. Outro dado que nos ajuda a corroborar essa hipótese é que a cepa CL Brener tratada com 32  $\mu$ M de mt-Dox apresentou o

mesmo sinal de morte, sem a exposição de fosfatidilserina, mostrando os mesmos marcadores para necrose (ASSIS, 2019). Inclusive, dados apresentados nessa tese mostraram que a morte de mt-Dox é sinalizada e foi revertida pela utilização de cafeína.

Como mt-Dox e UV podem levar à formação de lesões no DNA mitocondrial que interrompem o processo transcricional, em conjunto com outros dados, temos evidências que mostram que a mitocôndria de *T. cruzi* apresenta um reparo acoplado ao processo de transcrição com a participação de TcCSB. Além disso, essa resposta é sinalizada e representa uma via de sinalização importante para esse organismo, contando com a participação, de alguma forma ainda não clara, de TcKap7. Também foi demonstrado que o núcleo e a mitocôndria de *T. cruzi* respondem de maneira diferente ao mesmo tipo de lesão, indicando que as mitocôndrias desempenham um papel muito importante na sinalização celular que ainda precisa ser explorado.

O NER é a principal via de reparo que remove lesões volumosas, e sua subvia TC-NER está diretamente associada ao reparo transcricional. Essa subvia é ativada justamente pela paralisação da RNA polimerase. Para a montagem do complexo e reconhecimento da RNA polimerase parada, é essencial a presença das proteínas CSA e CSB. Possivelmente, a remoção dessa polimerase e a efetivação do reparo são mediadas por essas proteínas (COSTA; CHIGANÇAS; DA SILVA GALHARDO; CARVALHO; MENCK, 2003; LARSEN; RASMUSSEN; RASMUSSEN, 2005). Apesar de o *T. cruzi* não apresentar CSA em seu genoma, sua via do TC-NER atua apenas com o envolvimento de TcCSB (EL-SAYED; MYLER; BARTHOLOMEU; NILSSON; AGGARWAL; TRAN; GHEDIN; WORTHEY; DELCHER; BLANDIN; WESTENBERGER; CALER; CERQUEIRA; BRANCHE; HAAS; ANUPAMA; ARNER; SLUND *et al.*, 2005, MENDES, JUNIOR, FERREIRA, *no prelo*). Desde 1974, foram apresentadas evidências de que as mitocôndrias são incapazes de remover lesões volumosas, o que foi confirmado por vários outros estudos. Isso fundamenta a ausência do NER mitocondrial (B. PASCUCCI, 1997; CLAYTON; DODA; FRIEDBERG, 1974; LEDOUX; WILSON; BEECHAM; STEVNSNER *et al.*, 1992). Apesar de essas lesões não serem reparadas no mtDNA de mamíferos, algumas já foram descritas como removidas em leveduras por vias alternativas ainda não claras (YASUHIRA; YASUI, 2000). Devido à presença de uma única mitocôndria no *T. cruzi*, sua complexa estrutura do kDNA e seu processo de edição de RNA extremamente complexo, hipotetizamos que esse organismo deveria apresentar um sistema para lidar com lesões que interrompem o processo transcricional. Nesse trabalho, apresentamos evidências da presença desse reparo, com um envolvimento direto de

CSB para lidar com essas lesões, assim como no processo transcricional. Em mamíferos, foi observado que a proteína CSB está localizada na mitocôndria e desempenha um papel na remoção de 8-oxoguanina, interagindo com a proteína OGG1 (KAMENISCH; FOUSTERI; KNOCH; VON THALER *et al.*, 2010; STEVNSNER; NYAGA; DE SOUZA-PINTO; VAN DER HORST *et al.*, 2002), Também foi relatado seu envolvimento no processo de transcrição do mtDNA em conjunto com a proteína TFAM (BERQUIST; CANUGOVI; SYKORA; WILSON; BOHR, 2012). A deficiência dessa proteína em células humanas também foi associada a alterações nos processos de mitofagia (SCHEIBYE-KNUDSEN; RAMAMOORTHY; SYKORA; MAYNARD *et al.*, 2012), assim como no equilíbrio redox (GOPALAKRISHNAN; LOW; TING; SRIKANTH *et al.*, 2010; PASCUCCI; LEMMA; IORIO; GIOVANNINI *et al.*, 2012). O conjunto desses dados nos leva a pensar na presença de um TC-NER mitocondrial no *T. cruzi* com a atuação de CSB. No entanto, ainda não temos evidências suficientes para afirmar que essa seja uma via do TC-NER canônica. Mais estudos são necessários, incluindo a utilização de mutantes para as outras proteínas dessa via. Esses dados sugerem evidências do primeiro organismo a apresentar um TC-NER mitocondrial.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho oferece uma valiosa contribuição ao entendimento da singularidade da mitocôndria única do *T. cruzi*. Ajudamos a relatar evidências da presença de duas vias de reparo: a recombinação homóloga e a via de reparo acoplada ao processo de transcrição.

Em nossos estudos, mostramos que o heminocute de TcRad51 comprometeu o crescimento de células tratadas com mt-Dox, Dox e cisplatina. Além disso, foi mostrado que ela apresenta respostas diferentes quando as lesões são exclusivamente mitocondriais. Mostramos que TcTopo3 $\alpha$  também está envolvida no reparo mitocondrial pela utilização de mt-Dox, e, quando utilizamos um agente genotóxico que leva à formação de lesões em ambos os genomas, é possível observar uma resposta diferente de quando se tem uma lesão mitocondrial.

Foi apresentado aqui que TcCSB atua no reparo mitocondrial pelos agentes genotóxicos mt-Dox, cisplatina e UV. Sua superexpressão melhora o processo de reparo mitocondrial e nuclear para os tratamentos de UV e cisplatina, assim como sua depleção atrapalha o processo de reparo para os mesmos agentes genotóxicos. Pela utilização de Dox e mt-Dox, podemos também observar que a parada do processo transcricional tem respostas distintas entre núcleo e mitocôndria. Para a mitocôndria, a superexpressão de TcCSB favorece a sobrevivência, enquanto, para o núcleo, sua superexpressão aumenta a sensibilidade para os tratamentos de Dox.

Além disso, foi demonstrado que a depleção de TcCSB prejudica a recuperação dos números de transcritos em frente a lesões geradas por cisplatina. Apresentamos as primeiras evidências de uma mitocôndria reparando lesões volumosas que levam à parada do processo transcricional, visto que células humanas não são capazes de reparar danos causados por cisplatina e radiação UV. Estes resultados demonstram que o parasito possui mecanismos de metabolismo de DNA mitocondrial que podem ser únicos. Além de uma sinalização única, e importante, devido sua única mitocôndria.

## 7 REFERÊNCIAS

AGAPOV, A.; OLINA, A.; KULBACHINSKIY, A. RNA polymerase pausing, stalling and bypass during transcription of damaged DNA: from molecular basis to functional consequences. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 6, p. 3018-3041, 2022.

AGUIAR, P. H.; FURTADO, C.; REPOLÊS, B. M.; RIBEIRO, G. A. *et al.* Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2279, 2013.

AHMAD, M.; SHEN, W.; LI, W.; XUE, Y. *et al.* Topoisomerase 3beta is the major topoisomerase for mRNAs and linked to neurodevelopment and mental dysfunction. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. 5, p. 2704-2713, 2017.

AKBARI, M.; PEÑA-DIAZ, J.; ANDERSEN, S.; LIABAKK, N.-B. *et al.* Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. **DNA repair**, v. 8, n. 7, p. 834-843, 2009.

ALENCAR, R. R.; BATALHA, C.; FREIRE, T. S.; DE SOUZA-PINTO, N. C. Enzymology of mitochondrial DNA repair. **Enzymes**, v. 45, p. 257-287, 2019.

ALEXEYEV, M.; SHOKOLENKO, I.; WILSON, G.; LEDOUX, S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity—critical analysis and update. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 5, p. a012641, 2013.

ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA repair**, v. 6, n. 6, p. 695-711, 2007.

ALTMeyer, M.; LUKAS, J. To spread or not to spread—chromatin modifications in response to DNA damage. **Current opinion in genetics & development**, v. 23, n. 2, p. 156-165, 2013.

ALVES, C. L.; REPOLES, B. M.; DA SILVA, M. S.; MENDES, I. C. *et al.* The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 13335, 2018.

APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. **Res Microbiol**, v. 162, n. 7, p. 655-663, 2011.

APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I.; NELSON, R. E.; GAO, G. *et al.* Isolation of a U-insertion/deletion editing complex from *Leishmania tarentolae* mitochondria. **EMBO J**, v. 22, n. 4, p. 913-924, 2003.

APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I.; SIMPSON, L. A tale of two TUTases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 19, p. 10617-10622, 2003.

APHASIZHEVA, I.; ALFONZO, J.; CARNES, J.; CESTARI, I. *et al.* Lexis and Grammar of Mitochondrial RNA Processing in Trypanosomes. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 4, p. 337-355, 2020.

ASSIS, A. V. D. **Lesões no DNA nuclear e mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* sinalizam para diferentes tipos de morte.** 2019. Bioquímica e Imunologia - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

AUTEN, R. L.; WHITE, C. Oxidative and nitrosative stress and bronchopulmonary dysplasia. *In: **Bronchopulmonary dysplasia***: CRC Press, 2009. p. 123-135.

AVILA, H. A.; SIMPSON, L. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Rna**, v. 1, n. 9, p. 939-947, 1995.

AVLIYAKULOV, N. K.; LUKEŠ, J.; RAY, D. S. Mitochondrial histone-like DNA-binding proteins are essential for normal cell growth and mitochondrial function in *Crithidia fasciculata*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 2, p. 518-526, 2004.

B. PASCUCCI, A. V., A. VAN HOFFEN, A. A. VAN ZEELAND L. H. F. MULLENDERS AND E. DOGLIOTTI. **DNA Repair of UV Photoproducts and Mutagenesis in Human Mitochondrial DNA.** 1997.

BADJATIA, N.; NGUYEN, T. N.; LEE, J. H.; GÜNZL, A. *T rypanosoma brucei* harbours a divergent XPB helicase paralogue that is specialized in nucleotide excision repair and conserved among kinetoplastid organisms. **Molecular microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1293-1308, 2013.

BAKER, N.; CATTAPRETA, C.; NEISH, R.; SADLOVA, J. *et al.* Systematic functional analysis of *Leishmania* protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1244, 2021.

BAPTISTA, C. S.; VÊNCIO, R. Z.; ABDALA, S.; CARRANZA, J. C. *et al.* Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease:

Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. **Mol Biochem Parasitol**, v. 150, n. 2, p. 236-248, 2006.

BAPTISTA, C. S.; VÊNICO, R. Z. N.; ABDALA, S.; CARRANZA, J. C. *et al.* Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 236-248, 2006.

BASU, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. **J Nucleic Acids**, 2010, 2010.

BATEY, M. A.; ZHAO, Y.; KYLE, S.; RICHARDSON, C. *et al.* Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 6, p. 959-967, 2013.

BELLERA, C. L.; BALCAZAR, D. E.; ALBERCA, L.; LABRIOLA, C. A. *et al.* Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects. **J Chem Inf Model**, v. 53, n. 9, p. 2402-2408, 2013.

BENNE, R. RNA-editing in trypanosome mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1007, n. 2, p. 131-139, 1989.

BENNE, R.; VAN DEN BURG, J.; BRAKENHOFF, J. P. J.; SLOOF, P. *et al.* Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. **Cell**, v. 46, n. 6, p. 819-826, 1986.

BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 364, n. 26, p.2527-2534, 2011. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERNÁ, L.; CHIRIBAO, M. L.; GREIF, G.; RODRIGUEZ, M. *et al.* Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. **PeerJ**, v. 5, p. e3017, 2017.

BERQUIST, B. R.; CANUGOVI, C.; SYKORA, P.; WILSON, D. M., 3RD; BOHR, V. A. Human Cockayne syndrome B protein reciprocally communicates with mitochondrial proteins and promotes transcriptional elongation. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 17, p. 8392-8405, 2012.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-422, 2005.

BHATTI, S.; KOZLOV, S.; FAROOQI, A. A.; NAQI, A. *et al.* ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2977-3006, 2011.

BLACK, J. A.; CROUCH, K.; BRIGGS, E.; LEMGRUBER, L. *et al.* Widespread roles of *Trypanosoma brucei*. *In: ATR in nuclear genome function and transmission are linked to R-loops*. bioRxiv, p. 459654, 2021.

BLACKFORD, A. N.; JACKSON, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. **Molecular cell**, v. 66, n. 6, p. 801-817, 2017.

BLANC, V.; DAVIDSON, N. O. C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 3, p. 1395-1398, 2003.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 4, p. 297-308, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A a Z. **Doença de Chagas**. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 07 jan. 2024.

CANÇADO, J. R. LONG TERM EVALUATION OF ETIOLOGICAL TREATMENT OF CHAGAS DISEASE WITH BENZNIDAZOLE. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2002.

CARRANZA, J. C.; VALADARES, H. M. S.; D'ÁVILA, D. A.; BAPTISTA, R. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 9, p. 963-973, 2009.

CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S. *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2009.

CAVALCANTI, D. P.; SHIMADA, M. K.; PROBST, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S. *et al.* Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

CHAMBERLAIN, G. R.; TULUMELLO, D. V.; KELLEY, S. O. Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria. **ACS Chem Biol**, v. 8, n. 7, p. 1389-1395, 2013.

CHARLET-BERGUERAND, N.; FEUERHAHN, S.; KONG, S. E.; ZISERMAN, H. *et al.* RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. **The EMBO journal**, v. 25, n. 23, p. 5481-5491, 2006.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235-263, 2017.

CHEN, C.-C.; TYLER, J. Chromatin reassembly signals the end of DNA repair. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 7, n. 24, p. 3792, 2008.

CHEN, J.; FURANO, A. V. Breaking bad: The mutagenic effect of DNA repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 32, p. 43-51, 2015.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biol**, v. 9, n. 6, p. 190072, 2019.

CLAYTON, D. A.; DODA, J. N.; FRIEDBERG, E. C. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 7, p. 2777-2781, 1974.

COFFEY, G.; LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Mammalian mitochondrial extracts possess DNA end-binding activity. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 16, p. 3348-3354, 1999.

COLDWELL, K. E.; CUTTS, S. M.; OGNIBENE, T. J.; HENDERSON, P. T.; PHILLIPS, D. R. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 16, p. e100, set. 2008.

COMPE, E.; EGLY, J.-M. TFIIH: when transcription met DNA repair. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 6, p. 343-354, 2012.

COPELAND, W. C.; LONGLEY, M. J. Mitochondrial genome maintenance in health and disease. **DNA repair**, v. 19, p. 190-198, 2014.

COSTA-SILVA, H. M.; RESENDE, B. C.; UMAKI, A. C. S.; PRADO, W. *et al.* DNA topoisomerase 3 $\alpha$  is involved in homologous recombination repair and replication stress response in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 633195w, 2021.

COSTA, R. M.; CHIGANÇAS, V.; DA SILVA GALHARDO, R.; CARVALHO, H.; MENCK, C. F. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083-1099, 2003.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 813-824, 2007.

DA SILVA, R. B.; MACHADO, C. R.; RODRIGUES, A. R. A.; PEDROSA, A. L. Selective human inhibitors of ATR and ATM render *Leishmania major* promastigotes sensitive to oxidative damage. **PLoS One**, v. 13, n. 9, p. e0205033, 2018.

DAHAL, S.; RAGHAVAN, S. C. Mitochondrial genome stability in human: understanding the role of DNA repair pathways. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 6, p. 1179-1197, 2021.

DAMSMA, G. E.; ALT, A.; BRUECKNER, F.; CARELL, T.; CRAMER, P. Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 12, p. 1127-1133, 2007.

DAVIES, R. J. Ultraviolet radiation damage in DNA. **Biochemical Society Transactions**, v. 23, 1995.

DE MOURA, M. B.; SCHAMBER-REIS, B. L.; PASSOS SILVA, D. G.; RAJAO, M. A. *et al.* Cloning and characterization of DNA polymerase eta from *Trypanosoma cruzi*: roles for translesion bypass of oxidative damage. **Environ Mol Mutagen**, v. 50, n. 5, p. 375-386, 2009.

DE OLIVEIRA LOPES, D.; SCHAMBER-REIS, B. L. F.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; RAJÃO, M. A. *et al.* Biochemical studies with DNA polymerase  $\beta$  and DNA polymerase  $\beta$ -PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA repair**, v. 7, n. 11, p. 1882-1892, 2008.

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infect Immun**, v. 80, n. 7, p. 2258-2264, 2012.

DE SOUZA-PINTO, N. C.; MASON, P. A.; HASHIGUCHI, K.; WEISSMAN, L. *et al.* Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. **DNA Repair**, v. 8, n. 6, p. 704-719, 2009.

DE SOUZA, F. S. P.; RAMPAZZO, R. D. C. P.; MANHES, L.; SOARES, M. J. *et al.* Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 172, n. 2, p. 90-98, 2010.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, 2010.

DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S. P.; BRITTO, C.; VAN HEUVERSWYN, H. *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 63-70, 1988.

DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 6, p. 3483-3490, 2013.

DNDi - Drugs for Neglected Diseases initiative. **Chagas Disease**. Disponível em: [https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAjw5ImwBhBtEiwAFHDZx1xhcKyIFqvEXVPO04u1jah3OXY7P6ydOkgJQ68HzV3e4MTOaXBCwxcM3EQAvD\\_BwE](https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw5ImwBhBtEiwAFHDZx1xhcKyIFqvEXVPO04u1jah3OXY7P6ydOkgJQ68HzV3e4MTOaXBCwxcM3EQAvD_BwE). Acesso em: 26 mar. 2024.

EASTMAN, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. **Cancer cells (Cold Spring Harbor, N.Y. : 1989)**, v. 2, n. 8-9, p. 275-280, 1990 Aug-Sep 1990.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **THE TRYPANOSOMATID GENOMES**, 2005.

ENGLUND, P. T. Free minicircles of kinetoplast DNA in *Crithidia fasciculata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 11, p. 4895-4900, 1979.

ENGMAN, K. M. T. D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, 2001.

FAGBEMI, A. F.; ORELLI, B.; SCHÄRER, O. D. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 722-729, 2011.

FEAGIN, J. E.; JASMER, D. P.; STUART, K. Apocytochrome b and other mitochondrial DNA sequences are differentially expressed during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **Nucleic acids research**, v. 13, n. 12, p. 4577-4596, 1985.

FERNANDEZ-MOYA, S. M.; ESTEVEZ, A. M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 1, n. 1, p. 34-46, 2010.

FERREIRA, W. R. R. **Desvendando o reparo de DNA mitocondrial em *Trypanosoma cruzi***. Orientador: MACHADO, C. R. 2019. Bioquímica e Imunologia - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

FONSECA, S. B.; PEREIRA, M. P.; MOURTADA, R.; GRONDA, M. *et al.* Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. **Chem Biol**, v. 18, n. 4, p. 445-453, 2011.

FORREST, R. A.; SWIFT, L. P.; REPHAELI, A.; NUDELMAN, A. *et al.* Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 12, p. 1602-1612, 2012.

FORSYTHE, G. R. **DNA damage and the *Trypanosoma brucei* cell cycle**. 2012. University of Glasgow.

FOUSTERI, M.; VERMEULEN, W.; VAN ZEELAND, A. A.; MULLENDERS, L. H. **RETRACTED: Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo**. **Molecular cell**, v. 23, n. 4, p. 471-482, 2006.

FREIRE, A. C. G.; ALVES, C. L.; GOES, G. R.; RESENDE, B. C. *et al.* Catalase expression impairs oxidative stress-mediated signalling in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 144, n. 11, p. 1498-1510, 2017.

FRIEDBERG, E. C. A brief history of the DNA repair field. **Cell Res**, v. 18, n. 1, p. 3-7, 2008.

- FRIEDBERG, E. C. Nucleotide excision repair of DNA: The very early history. **DNA Repair**, v. 10, n. 7, p. 668-672, 2011.
- FRIEDBERG, E. C.; AGUILERA, A.; GELLERT, M.; HANAWALT, P. C. *et al.* DNA repair: From molecular mechanism to human disease. **DNA Repair**, v. 5, n. 8, p. 986-996, 2006.
- FURTADO, C.; KUNRATH-LIMA, M.; RAJÃO, M. A.; MENDES, I. C. *et al.* Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. 2012.
- GARTNER, A.; MILSTEIN, S.; AHMED, S.; HODGKIN, J.; HENGARTNER, M. O. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. **Molecular cell**, v. 5, n. 3, p. 435-443, 2000.
- GELOT, C.; LE-GUEN, T.; RAGU, S.; LOPEZ, B. S. Double-Strand Break Repair. *In: Genome Stability*, 2016. p. 337-351.
- GENOIS, M.-M.; PAQUET, E. R.; LAFFITTE, M.-C. N.; MAITY, R. *et al.* DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 1, p. 40-73, 2014.
- GERASIMOV, E. S.; GASPARYAN, A. A.; KAUROV, I.; TICHY, B. *et al.* Trypanosomatid mitochondrial RNA editing: dramatically complex transcript repertoires revealed with a dedicated mapping tool. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. 2, p. 765-781, Jan 25 2018.
- GHELLI LUSERNA DI RORA, A.; GHETTI, M.; LEDDA, L.; FERRARI, A. *et al.* Exploring the ATR-CHK1 pathway in the response of doxorubicin-induced DNA damages in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 39, n. 3, p. 795-811, Jun 2023.
- GIBSON, W. Kinetoplastea. *In: Handbook of the Protists*, 2016. cap. 7, p. 1-50.
- GIGLIA-MARI, G.; ZOTTER, A.; VERMEULEN, W. DNA damage response. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a000745, 2011.
- GILLIAM, L. A.; MOYLAN, J. S.; PATTERSON, E. W.; SMITH, J. D. *et al.* Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 302, n. 1, p. 195-202, 2012.
- GLUENZ, E.; POVELONES, M. L.; ENGLUND, P. T.; GULL, K. The kinetoplast duplication cycle in *Trypanosoma brucei* is orchestrated by cytoskeleton-mediated cell morphogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 5, p. 1012-1021, 2011.

GLUENZ, E.; SHAW, M. K.; GULL, K. Structural asymmetry and discrete nucleic acid subdomains in the *Trypanosoma brucei* kinetoplast. **Mol Microbiol**, v. 64, n. 6, p. 1529-1539, 2007.

GOLAS, M. M.; BOHM, C.; SANDER, B.; EFFENBERGER, K. *et al.* Snapshots of the RNA editing machine in trypanosomes captured at different assembly stages in vivo. **EMBO J**, v. 28, n. 6, p. 766-778, 2009.

GOLDEN, D. E.; HAJDUK, S. L. The 3'-untranslated region of cytochrome oxidase II mRNA functions in RNA editing of African trypanosomes exclusively as a cis guide RNA. **RNA**, v. 11, n. 1, p. 29-37, 2005.

GOODMAN, M. F.; WOODGATE, R. Translesion DNA polymerases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 10, p. a010363, 2013.

GOORMAGHTIGH, E.; HUART, P.; PRAET, M.; BRASSEUR, R.; RUYSSCHAERT, J.-M. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex Role in mitochondrial toxicity. **Biophysical Chemistry**, 1990.

GOPALAKRISHNAN, K.; LOW, G. K. M.; TING, A. P. L.; SRIKANTH, P. *et al.* Hydrogen peroxide induced genomic instability in nucleotide excision repair-deficient lymphoblastoid cells. **Genome Integr**, v. 1, n. 1, p. 16, 2010.

GORINI, S.; DE ANGELIS, A.; BERRINO, L.; MALARA, N. *et al.* Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. **Oxid Med Cell Longev**, p. 7582730, 2018.

GRYNBERG, P.; PASSOS-SILVA, D. G.; MOURÃO, M. D. M.; HIRATA JR, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Gene Expression in Response to Gamma Radiation. **PLOS ONE**, v.7, n. 1, p. e29596, 2012.

GUILBRIDE, D. L.; ENGLUND, P. T. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. **Journal of cell science**, v. 111, n. 6, p. 675-679, 1998.

GULERIA, A.; CHANDNA, S. ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. **DNA repair**, v. 39, p. 1-20, 2016.

HALL, A. B.; NEWSOME, D.; WANG, Y.; BOUCHER, D. M. *et al.* Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5674, 2014.

HANAWALT, P.; SPIVAK, G. Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:958-970. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 958-970, 2009.

HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: ten years after. **Molecular cell**, v. 28, n. 5, p. 739-745, 2007.

HARTUNG, F.; SUER, S.; KNOLL, A.; WURZ-WILDERSINN, R.; PUCHTA, H. Topoisomerase 3 $\alpha$  and RMI1 Suppress Somatic Crossovers and Are Essential for Resolution of Meiotic Recombination Intermediates in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 4, n. 12, p. e1000285, 2008.

HASHIMI, H.; CICOVA, Z.; NOVOTNA, L.; WEN, Y. Z.; LUKES, J. Kinetoplastid guide RNA biogenesis is dependent on subunits of the mitochondrial RNA binding complex 1 and mitochondrial RNA polymerase. **RNA**, v. 15, n. 4, p. 588-599, 2009.

HEAZLEWOOD, J. L.; HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H. Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. **Biochim Biophys Acta**, v.1604, n. 3, p. 159-169, 2003.

HENLE, E. S.; LINN, S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, v. 272, n. 31, p. 19095-19098, 1997.

HOEIJMAKERS, J. DNA repair mechanisms. **Maturitas**, v. 38, n. 1, p. 17-22, 2001.

HOLLOMAN, W. K. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. **Nature structural & molecular biology**, v.18, n. 7, p. 748-754, 2011.

HOLT, I. J. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 7, p. 358-365, 2009.

HONG, M.; SIMPSON, L. Genomic organization of *Trypanosoma brucei* kinetoplast DNA minicircles. **Protist**, v. 154, n. 2, p. 265-279, 2003.

HORTON, K. L.; PEREIRA, M. P.; STEWART, K. M.; FONSECA, S. B.; KELLEY, S. O. Tuning the activity of mitochondria-penetrating peptides for delivery or disruption. **Chembiochem**, v. 13, n. 3, p. 476-485, 2012.

HORTON, K. L.; STEWART, K. M.; FONSECA, S. B.; GUO, Q.; KELLEY, S. O. Mitochondria-penetrating peptides. **Chem Biol**, v. 15, n. 4, p. 375-382, 2008.

HOWELL, N. Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers. **International review of cytology**, v. 186, p. 49-116, 1998.

HU, J. J.; DUBIN, N.; KURLAND, D.; MA, B.-L.; ROUSH, G. C. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 2, p. 193-201, 1995.

HUANG, Y.; LI, L. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. **Transl Cancer Res**, v. 2, n. 3, p. 144-154, 2013.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R. *et al.* Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 6, p. 733-742, 2008.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L. *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

JEAN, S. R.; TULUMELLO, D. V.; RIGANTI, C.; LIYANAGE, S. U. *et al.* Mitochondrial Targeting of Doxorubicin Eliminates Nuclear Effects Associated with Cardiotoxicity. **ACS Chem Biol**, v.10, n. 9, p. 2007-2015, 2015.

JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. Network news: the replication of kinetoplast DNA. **Annual review of microbiology**, v. 66, p. 473-491, 2012.

JIN, S.; CORDES, N. ATM controls DNA repair and mitochondria transfer between neighboring cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 144, 2019.

JOHNSON, R. E.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Yeast and human translesion DNA synthesis polymerases: expression, purification, and biochemical characterization. **Methods in enzymology**, v. 408, p. 390-407, 2006.

KAMENISCH, Y.; FOUSTERI, M.; KNOCH, J.; VON THALER, A.-K. *et al.* Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of

subcutaneous fat, a hallmark of aging. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 379-390, 2010.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 478, n. 1, p. 23-43, 2001.

KAZAK, L.; REYES, A.; HOLT, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 10, p. 659-671, 2012.

KCIUK, M.; GIELECINSKA, A.; MUJWAR, S.; KOLAT, D. *et al.* Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. **Cells**, v. 12, n. 4, 2023.

KCIUK, M.; MARCINIAK, B.; KONTEK, R. Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 14, 2020.

KIM, K. S.; TEIXEIRA, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Transcription and editing of cytochrome oxidase II RNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1206-1211, 1994.

KLEIH, M.; BOPPLE, K.; DONG, M.; GAISLER, A. *et al.* Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. **Cell Death Dis**, v. 10, n. 11, p. 851, 2019.

KOKIC, G.; WAGNER, F. R.; CHERNEV, A.; URLAUB, H.; CRAMER, P. Structural basis of human transcription – DNA repair coupling. **Nature**, v. 598, n. 7880, p. 368-372, 2021.

KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KOPINSKI, P. K.; JANSSEN, K. A.; SCHAEFER, P. M.; TREFELY, S. *et al.* Regulation of nuclear epigenome by mitochondrial DNA heteroplasmy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 32, p. 16028-16035, 2019.

KOSLOWSKY, D. J.; BHAT, G. J.; PERROLLAZ, A. L.; FEAGIN, J. E.; STUART, K. The MURF3 gene of *T. brucei* contains multiple domains of extensive editing and is homologous to a subunit of NADH dehydrogenase. **Cell**, v. 62, n. 5, p. 901-911, 1990.

KOSLOWSKY, D. J.; BHAT, G. J.; READ, L. K.; STUART, K. Cycles of Progressive Realignment of gRNA with mRNA in RNA Editing. **Cell**, v. 67, p. 537-546, 1991.

KOZHUKHAR, N.; SPADAFORA, D.; FAYZULIN, R.; SHOKOLENKO, I. N.; ALEXEYEV, M. The efficiency of the translesion synthesis across abasic sites by mitochondrial DNA polymerase is low in mitochondria of 3T3 cells. **Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal**, v. 27, n. 6, p. 4390-4396, 2016.

KRASICH, R.; COPELAND, W. C. DNA polymerases in the mitochondria: A critical review of the evidence. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 22, n. 4, p. 692-709, 2017.

KUNRATH-LIMA, M.; REPOLÊS, B. M.; ALVES, C. L.; FURTADO, C. *et al.* Characterization of Trypanosoma cruzi MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 332-342, 2017.

LACOMBLE, S.; VAUGHAN, S.; GADELHA, C.; MORPHEW, M. K. *et al.* Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in Trypanosoma brucei. **J Cell Sci**, v. 123, n. 17, p. 2884-2891, 2010.

LAGERWERF, S.; VROUWE, M. G.; OVERMEER, R. M.; FOUSTERI, M. I.; MULLENDERS, L. H. DNA damage response and transcription. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 743-750, 2011.

LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Double strand break rejoining by mammalian mitochondrial extracts. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 4, p. 1198-1204, 1999.

LARSEN, N. B.; RASMUSSEN, M.; RASMUSSEN, L. J. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? **Mitochondrion**, v. 5, n. 2, p. 89-108, 2005.

LECHUGA-VIECO, A. V.; LATORRE-PELLICER, A.; JOHNSTON, I. G.; PROTA, G. *et al.* Cell identity and nucleo-mitochondrial genetic context modulate OXPHOS performance and determine somatic heteroplasmy dynamics. **Science advances**, v. 6, n. 31, p. eaba5345, 2020.

LEDOUX, S. P.; WILSON, G. L.; BEECHAM, E. J.; STEVNSNER, T. *et al.* Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 11, p. 1967-1973, 1992.

LEE, J. H.; JUNG, H. S.; GÜNZL, A. Transcriptionally active TFIIF of the early-diverged eukaryote Trypanosoma brucei harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 11, p. 3811-3820, 2009.

- LERNER, L. K.; FRANCISCO, G.; SOLTYS, D.T.; ROCHA, C. R. *et al.* Predominant role of DNA polymerase eta and p53 - dependent translesion synthesis in the survival of ultraviolet-irradiated human cells. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. 3, p. 1270-1280, 2017.
- LI, F.; GE, P.; HUI, W. H.; ATANASOV, I. *et al.* Structure of the core editing complex (L-complex) involved in uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosomatid mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 30, p. 12306-12310, 2009.
- LIANG, B. C.; ULLYATT, E. Increased sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis with mitochondrial DNA depletion. **Cell Death & Differentiation**, v. 5, n. 8, p. 694-701, 1998.
- LIDANI, K. C. F.; ANDRADE, F. A.; BAVIA, L.; DAMASCENO, F. S. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Front Public Health**, v. 7, p. 166, 2019.
- LING, F.; MAKISHIMA, F.; MORISHIMA, N.; SHIBATA, T. A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast. **The EMBO journal**, v. 14, n. 16, p. 4090-4101, 1995.
- LIPSCOMB, L. A.; PEEK, M. E.; ZHOU, F. X.; BERTRAND, J. A. *et al.* Water ring structure at DNA interfaces: hydration and dynamics of DNA-anthracycline complexes. **Biochemistry**, v. 33, n. 12, p. 3649-3659, 1994.
- LISMONT, C.; REVENCO, I.; FRANSEN, M. Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3673, 2019.
- LISVANE SILVA, P.; MANTILLA, B. S.; BARISON, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The uniqueness of the Trypanosoma cruzi mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 20, p. 2074-2099, 2011.
- LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E.; ENGLUND, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 8, p. 363-369, 2005.
- LIU, S.; WANG, H.; LI, X.; ZHANG, F. *et al.* Structural basis of gRNA stabilization and mRNA recognition in trypanosomal RNA editing. **Science**, v. 381, n. 6653, p. eadg4725, 2023.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPEZ-GARCIA, A.; GILABERT, J. A. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. **Trop Med Int Health**, v. 28, n. 9, p. 689-698, 2023.

LUKEŠ, J.; HINES, J. C.; EVANS, C. J.; AVLIYAKULOV, N. K. *et al.* Disruption of the *Crithidia fasciculata* KAP1 gene results in structural rearrangement of the kinetoplast disc. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 117, n. 2, p. 179-186, 2001.

MACALUSO, G.; GRIPPI, F.; DI BELLA, S.; BLANDA, V. *et al.* A Review on the Immunological Response against *Trypanosoma cruzi*. **Pathogens**, v. 12, n. 2, 2023.

MACHADO-SILVA, A.; CERQUEIRA, P. G.; GRAZIELLE-SILVA, V.; GADELHA, F. R. *et al.* How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 767, p. 8-22, 2016.

MACHADO, C. R.; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; MENDES, I. C.; RAJÃO, M. A. *et al.* Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription. **Mol Microbiol**, v. 92, n. 4, p. 756-776, 2014.

MADEJ, M. J.; ALFONZO, J. D.; HUTTENHOFER, A. Small ncRNA transcriptome analysis from kinetoplast mitochondria of *Leishmania tarentolae*. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 5, p. 1544-1554, 2007.

MADEJ, M. J.; NIEMANN, M.; HUTTENHOFER, A.; GORINGER, H. U. Identification of novel guide RNAs from the mitochondria of *Trypanosoma brucei*. **RNA Biol**, v. 5, n. 2, p. 84-91, 2008.

MARIN, P. A.; OBONAGA, R.; PAVANI, R. S.; DA SILVA, M. S. *et al.* ATR kinase is a crucial player mediating the DNA damage response in *Trypanosoma brucei*. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 602956, 2020.

MARTEIJN, J. A.; LANS, H.; VERMEULEN, W.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 465-481, 2014.

MARTINEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol**, p. 525241, 2010.

MARTÍNEZ, A.; PROLO, C.; ESTRADA, D.; RIOS, N. *et al.* Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 18, p. 8879-8888, 2019.

MARTINS-MELO, F. R.; ALENCAR, C. H.; RAMOS, A. N., JR.; HEUKELBACH, J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.

MARULLO, R.; WERNER, E.; DEGTYAREVA, N.; MOORE, B. *et al.* Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81162, 2013.

MASLOV, D. A.; OPPERDOES, F. R.; KOSTYGOV, A. Y.; HASHIMI, H. *et al.* Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, v. 146, n. 1, p. 1-27, 2019.

MASON, P. A.; MATHESON, E. C.; HALL, A. G.; LIGHTOWLERS, R. N. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 1052-1058, 2003.

MASUDA, H.; TANAKA, T.; TAKAHAMA, U. Cisplatin Generates Superoxide Anion by Interaction with DNA in a Cell-Free System. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 2, p. 1175-1180, 1994.

MAZIN, A. V.; MAZINA, O. M.; BUGREEV, D. V.; ROSSI, M. J. Rad54, the motor of homologous recombination. **DNA repair**, v. 9, n. 3, p. 286-302, 2010.

MCCULLOCH, S. D.; KOKOSKA, R. J.; MASUTANI, C.; IWAI, S. *et al.* Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 97-100, 2004.

MENDES, I. C. **O papel dos genes TcCSB e TcXPC no metabolismo**

**de DNA em Trypanosoma cruzi**. Orientador: MACHADO, C. R. 2015. Bioquímica e Imunologia - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

MICHELOTTI, E. F.; HARRIS, M. E.; ADLER, B.; TORRI, A. F.; HAJDUK, S. L. *Trypanosoma brucei* mitochondrial ribosomal RNA synthesis, processing and developmentally regulated expression. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 54, n. 1, p. 31-41, 1992.

MISHRA, A.; SAXENA, S.; KAUSHAL, A.; NAGARAJU, G. RAD51C/XRCC3 Facilitates Mitochondrial DNA Replication and Maintains Integrity of the Mitochondrial Genome. **Mol Cell Biol**, v. 38, n. 3, 2018.

MITCHELL, D. L.; JEN, J.; CLEAVER, J. E. Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. **Photochem Photobiol**, v. 54, n. 5, p. 741-746, 1991.

MORINI, F. S. **CARACTERIZAÇÃO DE TcKAP7: UMA PROTEÍNA ASSOCIADA AO CINETOPLASTO DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi***. Orientador: FRAGOSO, S. P. 2015. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.

MOSER, J.; KOOL, H.; GIAKZIDIS, I.; CALDECOTT, K. *et al.* RETRACTED: Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1 and DNA Ligase III $\alpha$  in a Cell-Cycle-Specific Manner. **Molecular cell**, v. 27, n. 2, p. 311-323, 2007.

MURATA, T.; HIBASAMI, H.; MAEKAWA, S.; TAGAWA, T.; NAKASHIMA, K. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells. **Biochemistry international**, v. 20, n. 5, p. 949-955, 1990.

NICHOLLS, T. J.; NADALUTTI, C. A.; MOTORI, E.; SOMMERVILLE, E. W. *et al.* Topoisomerase 3 $\alpha$  Is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA. **Mol Cell**, v. 69, n. 1, p. 9-23 e26, 2018.

NIMONKAR, A. V.; GENSCHEL, J.; KINOSHITA, E.; POLACZEK, P. *et al.* BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. **Genes & development**, v. 25, n. 4, p. 350-362, 2011.

NISSANKA, N.; BACMAN, S. R.; PLASTINI, M. J.; MORAES, C. T. The mitochondrial DNA polymerase gamma degrades linear DNA fragments precluding the formation of deletions. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 2491, 2018.

NOEL, W.; RAES, G.; HASSANZADEH GHASSABEH, G.; DE BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 3, p. 126-133, 2004.

NOGUEIRA, N. P. D. A.; SOUZA, C. F. D.; SARAIVA, F. M. D. S.; SULTANO, P. E. *et al.* Heme-Induced ROS in *Trypanosoma Cruzi* Activates CaMKII-Like That Triggers

- Epimastigote Proliferation. One Helpful Effect of ROS. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25935, 2011.
- OCHS, D. E.; OTSUB, K.; TEIXEIRAB, S. M. R.; MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V. Maxicircle genomic organization and editing of an ATPase subunit 6 RNA in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, p. 267-278, 1996.
- OCHSENREITER, T.; CIPRIANO, M.; HAJDUK, S. L. KISS: the kinetoplastid RNA editing sequence search tool. **RNA**, v. 13, n. 1, p. 1-4, 2007.
- ODELL, I. D.; WALLACE, S. S.; PEDERSON, D. S. Rules of engagement for base excision repair in chromatin. **Journal of cellular physiology**, n. 228, n. 2, p. 258-266, 2013.
- OGBADOYI, E. O.; ROBINSON, D. R.; GULL, K. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 5, p. 1769-1779, 2003.
- OGI, T.; LIMSIRICHAIKUL, S.; OVERMEER, R. M.; VOLKER, M. *et al.* Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. **Molecular cell**, v. 37, n. 5, p. 714-727, 2010.
- OLIVERO, O. A.; SEMINO, C.; KASSIM, A.; LOPEZ-LARRAZA, D. M.; POIRIER, M. C. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA of Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, 1995.
- OUYANG, J.; YADAV, T.; ZHANG, J.-M.; YANG, H. *et al.* RNA transcripts stimulate homologous recombination by forming DR-loops. **Nature**, v. 594, n. 7862, p. 283-288, 2021.
- PAES, M. C. The journey of *Trypanosoma cruzi* under the redox baton. *In: Biology of Trypanosoma cruzi*: IntechOpen, 2019.
- PAHO. **Chagas disease**. Washington, 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 07 jan. 2023.
- PANIGRAHI, A. K.; SCHNAUFER, A.; ERNST, N. L.; WANG, B. *et al.* Identification of novel components of *Trypanosoma brucei* editosomes. **RNA**, v. 9, n. 4, p. 484-492, 2003.
- PASCUCCI, B.; LEMMA, T.; IORIO, E.; GIOVANNINI, S. *et al.* An altered redox balance mediates the hypersensitivity of Cockayne syndrome primary fibroblasts to oxidative stress. **Aging Cell**, v. 11, n. 3, p. 520-529, 2012.

PASCUCCI, B.; VERSTEEGH, A.; VAN HOFFEN, A.; VAN ZEELAND, A. *et al.* DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. **Journal of molecular biology**, v. 273, n. 2, p. 417-427, 1997.

PASSOS-SILVA, D. G.; RAJÃO, M. A.; NASCIMENTO DE AGUIAR, P. H.; VIEIRA-DARROCHA, J. P. *et al.* Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of nucleic acids**, 2010.

PEACOCK, L.; BAILEY, M.; GIBSON, W. Dynamics of gamete production and mating in the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 404, 2016.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PÉREZ-MORGA, D.; ENGLUND, P. T. The structure of replicating kinetoplast DNA networks. **The Journal of cell biology**, v. 123, n. 5, p. 1069-1079, 1993.

PETTEPHER, C. C.; LEDOUX, S. P.; BOHR, V. A.; WILSON, G. L. Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 5, p. 3113-3117, 1991.

PEYRONE, M. Ueber die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorür. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 51, n. 1, p. 1-29, 1844.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, 2000.

PODRATZ, J. L.; KNIGHT, A. M.; TA, L. E.; STAFF, N. P. *et al.* Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. **Neurobiol Dis**, v. 41, n. 3, p. 661-668, 2011.

POHJOISMÄKI, J. L.; BOETTGER, T.; LIU, Z.; GOFFART, S. *et al.* Oxidative stress during mitochondrial biogenesis compromises mtDNA integrity in growing hearts and induces a global DNA repair response. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 14, p. 6595-6607, 2012.

POMMIER, Y.; SUN, Y.; HUANG, S. N.; NITISS, J. L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 11, p. 703-721, 2016.

POVELONES, M. L. Beyond replication: division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 196, n. 1, p. 53-60, 2014.

PROUDFOOT, C.; MCCULLOCH, R. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 21, p. 6906-6919, 2005.

PUTNAM, C. D. Strand discrimination in DNA mismatch repair. **DNA Repair**, v. 105, p. 103161, 2021.

RAJAO, M. A. **Síntese translesão e reparo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: caracterização funcional da DNA polimerase kappa e análise da remoção de lesões no DNA nuclear e mitocondrial**. Orientador: MACHADO, C. R. 2011. Bioquímica e Imunologia - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

RASTOGI, R. P.; RICHA; KUMAR, A.; TYAGI, M. B.; SINHA, R. P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. **J Nucleic Acids**, p. 592980, 2010.

RAY, D. S. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 1365-1367, 1989.

READ, L. K.; MYLER, P. J.; STUART, K. Extensive editing of both processed and preprocessed maxicircle CR6 transcripts in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 2, p. 1123-1128, 1992.

REGIS-DA-SILVA, C. G.; FREITAS, J. M.; PASSOS-SILVA, D. G.; FURTADO, C. *et al.* Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 149, n. 2, p. 191-200, 2006.

REPOLÊS, B. M. **Metabolismo de DNA em *Trypanosomacruzi*: vias de reparo mitocondrial e formação de híbridos**. Orientador: MACHADO, C. R. 2019. - Bioquímica e Imunologia - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.

ROTTENBERG, S.; DISLER, C.; PEREGO, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 1, p. 37-50, 2021.

RUSMAN, F.; FLORIDIA-YAPUR, N.; TOMASINI, N.; DIOSQUE, P. Guide RNA Repertoires in the Main Lineages of *Trypanosoma cruzi*: High Diversity and Variable Redundancy Among Strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021. Original Research.

RYTER, S. W.; OTTERBEIN, L. E.; MORSE, D.; CHOI, A. M. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: Regulation and functional significance. **Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease**, p. 249-263, 2002.

SAGE, J. M.; GILDEMEISTER, O. S.; KNIGHT, K. L. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. **J Biol Chem**, v. 285, n. 25, p. 18984-18990, 2010.

SAKI, M.; PRAKASH, A. DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 107, p. 216-227, 2017.

SALE, J. E. Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 3, p. a012708, 2013.

SALINAS-GIEGÉ, T.; GIEGÉ, R.; GIEGÉ, P. tRNA biology in mitochondria. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 4518-4559, 2015.

SANTOS, J. H.; MEYER, J. N.; MANDAVILLI, B. S.; VAN HOUTEN, B. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. **DNA repair protocols: mammalian systems**, p. 183-199, 2006.

SARKAR, S.; DAVIES, A. A.; ULRICH, H. D.; MCHUGH, P. J. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase  $\zeta$ . **The EMBO journal**, v. 25, n. 6, p. 1285-1294, 2006.

SCHAMBER-REIS, B. L. F.; NARDELLI, S.; RÉGIS-SILVA, C. G.; CAMPOS, P. C. *et al.* DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 183, n. 2, p. 122-131, 2012.

SCHAUB, G. A. An Update on the Knowledge of Parasite-Vector Interactions of Chagas Disease. **Res Rep Trop Med**, v. 12, p. 63-76, 2021.

SCHEIBYE-KNUDSEN, M.; RAMAMOORTHY, M.; SYKORA, P.; MAYNARD, S. *et al.* Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. **J Exp Med**, v. 209, n. 4, p. 855-869, 2012.

SCHMITT, T. H.; FREZZATTI, W. A.; SCHREIER, S. Hemin-Induced Lipid Membrane Disorder and Increased Permeability: A Molecular Model for the Mechanism of Cell Lysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, n. 1, p. 96-103, 1993.

SCRIMA, A.; KONÍČKOVÁ, R.; CZYZEWSKI, B. K.; KAWASAKI, Y. *et al.* Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1–DDB2 complex. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1213-1223, 2008.

SEBESTA, M.; BURKOVICS, P.; JUHASZ, S.; ZHANG, S. *et al.* Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. **DNA repair**, v. 12, n. 9, p. 691-698, 2013.

SHAPIRO, T. A.; SHOWALTER, A. F. In vivo inhibition of trypanosome mitochondrial topoisomerase II: effects on kinetoplast DNA maxicircles. **Molecular and Cellular Biology**, 1994.

SHAW AUBIE, K.; KALEM MURAT, C.; ZIMMER SARA, L. Mitochondrial Gene Expression Is Responsive to Starvation Stress and Developmental Transition in *Trypanosoma cruzi*. **mSphere**, v. 1, n. 2, p. 00051-00016, 2016.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SHIMURA, T. ATM-Mediated Mitochondrial Radiation Responses of Human Fibroblasts. **Genes (Basel)**, v. 12, n. 7, 2021.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265-7279, 2003.

SIES, H. Role of Metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation: REDOX SIGNALING AND OXIDATIVE STRESS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SILVA, H. M. C. **Estudo dos mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA durante o estresse replicativo em *Trypanosoma cruzi***. Orientador: MACHADO, C. R. 2019. Bioquímica e Imunologia - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 363-380, 1987.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 13, p. 6986-6993, 2000.

SIMPSON, R. M.; BRUNO, A. E.; BARD, J. E.; BUCK, M. J.; READ, L. K. High-throughput sequencing of partially edited trypanosome mRNAs reveals barriers to editing progression and evidence for alternative editing. **RNA**, v. 22, n. 5, p. 677-695, 2016.

SIMPSON, R. M.; BRUNO, A. E.; CHEN, R.; LOTT, K. *et al.* Trypanosome RNA Editing Mediator Complex proteins have distinct functions in gRNA utilization. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. 13, p. 7965-7983, 2017.

SINHA, R. P.; HÄDER, D. P. UV induced DNA damage and repair: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.1, n. 4, p. 225-236, 2002.

SLOOF, P.; DE HAAN, A.; EIER, W.; VAN IERSEL, M. *et al.* The nucleotide sequence of the variable region in *Trypanosoma brucei* completes the sequence analysis of the maxicircle component of mitochondrial kinetoplast DNA. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 56, n. 2, p. 289-299, 1992.

SMITH, G. C.; JACKSON, S. P. The PIKK family of protein kinases. *In*: **Handbook of cell signaling**: Elsevier, 2010. p. 575-580.

SORENSEN, C. M.; EASTMAN, A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. **Cancer research**, v. 48, n. 23, p. 6703-6707, 1988.

SOUZA, W. D. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*:

from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 94, 1999.

SRIVASTAVA, S.; MORAES, C. T. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 7, p. 893-902, 2005.

STEIN, A.; SIA, E. A. Mitochondrial DNA repair and damage tolerance. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 22, n. 5, p. 920-943, 2017.

STERGIOU, L.; DOUKOUMETZIDIS, K.; SENDOEL, A.; HENGARTNER, M. O. The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 6, p. 1129-1138, 2007.

STEVENSNER, T.; NYAGA, S.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; VAN DER HORST, G. T. *et al.* Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8675-8682, 2002.

STRACKER, T. H.; PETRINI, J. H. The MRE11 complex: starting from the ends. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 90-103, 2011.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

SUN, Y.; MCCORVIE, T. J.; YATES, L. A.; ZHANG, X. Structural basis of homologous recombination. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, p. 3-18, 2020.

SWIFT, L. P.; REPHAELI, A.; NUDELMAN, A.; PHILLIPS, D. R.; CUTTS, S. M. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer Res**, v. 66, n. 9, p. 4863-4871, 2006.

SWUEC, P.; COSTA, A. Molecular mechanism of double Holliday junction dissolution. **Cell & bioscience**, v. 4, p. 36, 2014.

SZAKACS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 219-234, 2006.

TABASI, M.; AMANLOU, M.; SIADAT, S. D.; NOORMOHAMMADI, Z. *et al.* Novel Molecular Anti-Colorectal Cancer Conjugate: Chlorambucil-Adipic Acid Dihydrazide-Glutamine. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 13, 2013.

TADI, S. K.; SEBASTIAN, R.; DAHAL, S.; BABU, R. K. *et al.* Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. **Molecular biology of the cell**, v. 27, n. 2, p. 223-235, 2016.

TANG, J.-B.; SVILAR, D.; TRIVEDI, R. N.; WANG, X.-H. *et al.* N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase  $\beta$  modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. **Neuro-oncology**, v. 13, n. 5, p. 471-486, 2011.

TAYLOR, M. B.; GUTTERIDG, W. E. Trypanosoma cruzi: Subcellular Distribution of Glycolytic and Some Related Enzymes of Epimastigotes. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY**, v. 63, 1987.

TELLERIA, J.; BIRON, D. G.; BRIZARD, J. P.; DEMETTRE, E. *et al.* Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in Trypanosoma cruzi. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 47, p. 20411-20416, 2010.

THOMAS, S.; MARTINEZ, L. L. I. T.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. A population study of the minicircles in Trypanosoma cruzi: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 133, 2007.

TSAI, H. Z.; LIN, R. K.; HSIEH, T. S. Drosophila mitochondrial topoisomerase III alpha affects the aging process via maintenance of mitochondrial function and genome integrity. **J Biomed Sci**, v. 23, p. 38, 2016.

TSANG, W. P.; CHAU, S. P.; KONG, S. K.; FUNG, K. P.; KWOK, T. T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. **Life Sci**, v. 73, n. 16, p. 2047-2058, 2003.

VALENZUELA, L.; SEPÚLVEDA, S.; PONCE, I.; GALANTI, N.; CABRERA, G. The overexpression of TcAP1 endonuclease confers resistance to infective Trypanosoma cruzi trypomastigotes against oxidative DNA damage. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 5985-5995, 2018.

VAN DER SPEK, P. J.; SMIT, E. M.; BEVERLOO, H. B.; SUGASAWA, K. *et al.* Chromosomal localization of three repair genes: the xeroderma pigmentosum group C gene and two human homologs of yeast RAD23. **Genomics**, v. 23, n. 3, p. 651-658, 1994.

VAN HOFFEN, A.; VENEMA, J.; MESCHINI, R.; VAN ZEELAND, A.; MULLENDERS, L. Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. **The EMBO journal**, v. 14, n. 2, p. 360-367, 1995.

VENDETTI, F. P.; LAU, A.; SCHAMUS, S.; CONRADS, T. P. *et al.* The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44289, 2015.

VERMEULEN, W.; FOUSTERI, M. Mammalian transcription-coupled excision repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 8, p. a012625, 2013.

VERNER, Z.; BASU, S.; BENZ, C.; DIXIT, S. *et al.* Malleable mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 315, p. 73-151, 2015.

VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; PASSOS-SILVA, D. G.; MENDES, I. C.; ROCHA, E. A. *et al.* The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome. **DNA Repair (Amst)**, v. 73, p. 78-90, 2019.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.

WANG, J.; PAPPAS-BROWN, V.; ENGLUND, P. T.; JENSEN, R. E. TbKAP6, a mitochondrial HMG box-containing protein in *Trypanosoma brucei*, is the first trypanosomatid kinetoplast-associated protein essential for kinetoplast DNA replication and maintenance. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 7, p. 919-932, 2014.

WANG, S.; MILLER, W.; MILTON, J.; VICKER, N. *et al.* Structure–activity relationships for analogues of the phenazine-based dual topoisomerase I/II inhibitor XR11576. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 3, p. 415-418, 2002.

WENG, J.; APHASIZHEVA, I.; ETHERIDGE, R. D.; HUANG, L. *et al.* Guide RNA-binding complex from mitochondria of trypanosomatids. **Mol Cell**, v. 32, n. 2, p. 198-209, 2008.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**, v.7, p. 60, 2006.

WHO. 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 07 jan. 2024.

WISNOVSKY, S.; JEAN, S. R.; KELLEY, S. O. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. **Nat Chem Biol**, v. 12, n. 7, p. 567-573, 2016.

WISNOVSKY, S.; SACK, T.; PAGLIARINI, D. J.; LAPOSA, R. R.; KELLEY, S. O. DNA polymerase  $\theta$  increases mutational rates in mitochondrial DNA. **ACS chemical biology**, v.13, n. 4, p. 900-908, 2018.

XU, C. W.; HINES, J. C.; ENGEL, M. L.; RUSSELL, D. G.; RAY, D. S. Nucleus-Encoded Histone H1-Like Proteins Are Associated with Kinetoplast DNA in the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 2, n. 16, 1996.

XU, J.; LAHIRI, I.; WANG, W.; WIER, A. *et al.* Structural basis for the initiation of eukaryotic transcription-coupled DNA repair. **Nature**, 551, n. 7682, p. 653-657, 2017.

XU, Z.; ZHANG, J.; XU, M.; JI, W. *et al.* Rice RAD 51 paralogs play essential roles in somatic homologous recombination for DNA repair. **The Plant Journal**, v. 95, n. 2, p. 282-295, 2018.

YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 2, p. 514-519, 1997.

YANG, J. L.; WEISSMAN, L.; BOHR, V. A.; MATTSON, M. P. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. **DNA Repair (Amst)**, v. 7, n. 7, p. 1110-1120, 2008.

YANG, Z.; SCHUMAKER, L. M.; EGORIN, M. J.; ZUHOWSKI, E. G. *et al.* Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 19, p. 5817-5825, 2006.

YASUHIRA, S.; YASUI, A. Alternative Excision Repair Pathway of UV-damaged DNA in *Schizosaccharomyces pombe* Operates Both in Nucleus and in Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11824-11828, 2000.

YOKOI, M.; MASUTANI, C.; MAEKAWA, T.; SUGASAWA, K. *et al.* The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9870-9875, 2000.

YOSHIDA, Y.; IZUMI, H.; TORIGOE, T.; ISHIGUCHI, H. *et al.* P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. **Cancer research**, v. 63, n. 13, p. 3729-3734, 2003.

ZOU, L.; ELLEDGE, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1542-1548, 2003.

ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. P.; MAIA, M. C.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 5, p. 449-456, 2011.

## 8 APÊNDICE A – Artigo submetido

### Revista DNA repair

### Transcription coupled repair occurrence in *Trypanosoma cruzi* mitochondria

**Authors:** Wesley Roger Rodrigues Ferreira<sup>1</sup>, Bruno Marçal Repolês<sup>1</sup>, Antônio Vinicius de Assis<sup>1</sup>, Isabela Cecília Mendes<sup>1</sup>, Andrea Mara Macedo<sup>1</sup>, Glória Regina Franco<sup>1</sup>, Flávia Souza Morini<sup>3</sup>, Shana O. Kelley<sup>4</sup>, Camila Silva Gonçalves<sup>4,5</sup>, Carolina Moura Costa Catta-Preta<sup>6\*\*</sup>, Jeremy C. Mottram<sup>6</sup>, Maria Cristina M. Motta<sup>2</sup>, Stênio Perdigão Frago<sup>3</sup>, Carlos Renato Machado<sup>1\*</sup>

**1** Laboratório de Genética Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil

**2** Laboratório de Biologia Molecular e Sistêmica de Tripanossomatídeos, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brasil

**3** Department of Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada.

**4** Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão (CPMP), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**5** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagens – Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**6** Department of Biology, York Biomedical Research Institute, University of York, Wentworth Way, Heslington, York YO10 5DD, UK.

\* Corresponding author at Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 30161-970, Brazil.

E-mail address: crmachad@icb.ufmg.br.

\*\* Present address: Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

#### ABSTRACT

Although several proteins of the DNA repair systems have already been described as present on *T. cruzi* mitochondrion, there is limited information available regarding the DNA repair pathways involved on the kinetoplast DNA (kDNA) maintenance. As Trypanosomatids possess only one mitochondrion per cell, it can be expected that they have divergent DNA maintenance processes compared to other eukaryotes. Trypanosomatids harbor a distinct set of proteins dedicated to kinetoplast metabolism, known as kinetoplast associated proteins (KAP). Despite some studies pinpointing the location of those proteins to the antipodal sites, their functions remain unclear. Here we demonstrate that the absence of TcKAP7 is related to sensitivity to UV radiation and cisplatin. This phenotype has also been observed in mutants of *Angomonas deanei* mutants, a trypanosomatid that live as parasite in the gastrointestinal tract of insects. Additionally, we show that the DNA damage inflicted on the kinetoplast can induce

distinct forms of cell death signaling. Moreover, we elucidated the involvement of CSB in this response, indicating a potential link between TcKAP7 and CSB proteins in DNA transcription-coupled repair, thereby representing one of the initial descriptions of such a DNA repair mechanism following UV radiation and cisplatin exposure in mitochondria.

**Keywords:** *DNA damage response, TC-NER, Mitochondrial DNA Repair, TcKap7 gene, CSB gene.*

## 1. INTRODUCTION

Trypanosomatidae is an order that includes pathogenic and non-pathogenic organisms that are part of the Kinetoplastida group. Like all other known Kinetoplastida members, these parasites possess a single and unique mitochondrion, spreaded throughout the parasite's cell body [1,2]. The multiple copies of the kDNA are compacted and condensed in a single region, called kinetoplast disc (kDNA disc) [3,4]. Inside this disk the copies of the kDNA are organized in a network of concatenated rings of minicircles, which contains the most of the RNA editing machinery, and maxicircles, containing the genes of the respiratory chain [5]. This organization results in exclusive processes regarding the DNA metabolism process, such as the replication process, which involves several proteins and mechanisms that differ from those in other eukaryotes [1,6].

In all organisms, the mitochondrial genome is susceptible to the same DNA damage sources as the nuclear genome but DNA repair in this organelle remains elusive. In higher eukaryotes, several DNA repair proteins have already been described to act on the mitochondrial genome [7,8], with most of the studies focusing on the oxidative damage response and the base excision repair (BER) [9–12]. DNA double-strand breaks have been implicated on the mtDNA metabolism in fungi and some groups of plants [13–15]. Proteins from the mismatch repair have also been described in some human cell lineages [16–18]. Canonically, damages caused on the mtDNA by ultraviolet radiation, such as CPDs and 6-4 photoproducts, are reported as not being repaired by human fibroblasts [19,20]. Additionally, mitochondria of mammals lack the capability to repair DNA adducts such as those generated by cisplatin [21,22]. Lastly, some of the DNA repair proteins that have already been described as involved in mitochondrial metabolism are performing non-canonical functions [8,23–25] but repair of DNA adducts in the mtDNA has not yet been clearly demonstrated.

The kDNA metabolism involves several kinetoplast-associated proteins (KAP). These proteins, initially described as histone H1-like proteins, are encoded by nuclear sequences [26] and are presented in variable numbers among the different groups of trypanosomatids parasites.

Their crucial roles in kDNA organization and function have been demonstrated through various studies. For instance, the knockout of CfKAP1 caused the disorganization of the kDNA network in *Crithidia fasciculata*, while the knockout of CfKAP2 and CfKAP3, caused replication problems and altered expression of maxicircle genes, along with reduced the oxygen consumption [27]. Moreover, depletion of TbKAP6 in *Trypanosoma brucei* led to impaired growth, accompanied by the loss of the kDNA and disorganization of the kDNA disc [28]. Interestingly, in *Angomonas deanei*, a symbiont-harboring trypanosomatid, four KAP proteins have been identified, which are specifically related to the symbiotic process in this organism [29,30].

Several studies have already investigated the kDNA metabolism following damage in *T. cruzi* and *A. deanei*. For instance, investigations have identified specific proteins, including TcMYH and TcOGG1, implicated in the GO system and 8-oxoguanine response, which play vital roles in regulating kDNA metabolism [31,32]. Additionally, a mitochondrial copy of TcPol $\kappa$  has been described, facilitating the polymerization of intermediates of the homologous recombination on the kDNA [33]. Furthermore, the localization of two other crucial polymerases, TcPol $\beta$  and TcPol $\beta$ -PAK to the kinetoplast of those parasites has been elucidated. While both enzymes exhibit DRP-lyase activities and contribute to reducing the amount of 8-oxodG on the kDNA of overexpressing parasites, only TcPol $\beta$ -PAK demonstrate translesion synthesis capabilities in the presence of modified guanine [34,35]. In *T. cruzi*, investigations have highlighted the dynamic localization patterns of TcKAP4 and TcKAP6 within the kDNA disk, contingent upon the cell cycle stage of the parasite [36]. Conversely, knockout studies targeting TcKAP3 revealed no discernible alterations in kDNA structure or organization, nor did they impact cell proliferation, differentiation or infectivity for *T. cruzi*, indicating potential redundancy or overlapping functions among KAP proteins [37]. Similarly, in *A. deanei*, the knockout of KAP4 showed that, though not essential for the trypanosomatid's viability, was found to be implicated in kDNA arrangement and replication processes [38].

The most extensively characterized repair pathway for dealing with transcription-blocked lesions in other organisms is transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER). Although it has been observed that NER activity is absent within mammalian mitochondria [19,41], proteins associated with this pathway have been identified within this organelle, where they perform alternative functions in various repair mechanisms, such as mismatch repair, homologous recombination repair, non-homologous end joining, and base excision repair (BER) [8,42]. Given the distinct characteristics of kDNA, we hypothesize whether a

transcriptional halt might also trigger recognition by the CSB protein, potentially aided by a kinetoplast-associated protein.

In this work we investigate the kDNA metabolism post-damage in two different trypanosomatids: *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease and *Angomonas deanei*, a non-pathogenic parasite. We evaluated the response to DNA damage induced by several distinct agents in double knockout cells for *T. cruzi* and single knockout *A. deanei* cells for the KAP7 protein. Furthermore, we explore the involvement of the CSB protein in *T. cruzi* following DNA damage induction, observing heightened sensitivity and alterations in the kinetoplast transcription in the mutant parasites treated with DNA-damaging agents.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Cellular strains and culture

Epimastigotes of *T. cruzi* clones Dm28c strain, Cl Brener strain and all mutants used in this work were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% complement-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), 200 units/mL penicillin, and 200 µg/L streptomycin sulfate, at 28 °C. Cell counting was performed using a cytometric chamber, with erythrosine as vital dye to discriminate between viable and non-viable cells as necessary.

### 2.2 Tagged TcKAP7 Plasmid construction

The sequence of TcKAP7 gene (TritypDB ID: Tc00.1047053508719.50) was retrieved from TritypDB database. This gene was amplified by PCR using specific primers (Table 1) from Dm28c WT clone in reactions containing 100 ng of genomic DNA, 10 pmol of each primer, 200 µM of each dNTP, 1,5mM of MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Platinum Taq DNA polymerase buffer and 2,5 U of Platinum Taq DNA polymerase (ThermoFisher/Invitrogen cat: 10966034) per reaction. The forward and reverse primers included sequences *attB1* and *attB2R* respectively. Following amplification, the gene was cloned into the vector pDONR<sup>TM</sup>221 (ThermoFisher/Invitrogen) using 150 ng of the gene of interest, 150 ng of the vector, 1 µL of BP Clonase<sup>TM</sup> enzyme mix and water to a total volume of 10 µL. The reaction was incubated at 25°C for 16 hours, after which 1 µL of proteinase K (2mg/mL) was added and the mixture was incubated at 37°C for 10 minutes. The resulting product was used in transfection of calcium competent DH5α *E. coli* cells. Transformed cultures were plated onto LB medium containing 25 µg/L of kanamycin for selection and incubated for 16 hours at 37°C. Positive clones were identified by PCR and plasmids were extracted using the QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen

cat: 27104). TcKAP7 gene was subsequently cloned into the vector pTcGW, which harbors a neomycin resistance gene [85], using the Gateway cloning system (ThermoFisher/Invitrogen cat: 11791043). The resulting construct, named pNEO\_TcKAP7\_3xFLAG, was transformed in calcium competent DH5 $\alpha$  *E. coli* cells. Selection again was also performed via PCR.

### **2.3 Recombinant TcKAP7 expression, purification and immunization**

The TcKAP7 sequence was amplified using RecKAP7F and RecKAP7R primers (Table 1) and cloned into the pET28a vector. After transformation into DH5 $\alpha$  *E. coli*, positive clones were confirmed by PCR, and plasmid DNA was extracted. Recombinant TcKAP7 protein expression was achieved in BL21 (DE3) STAR bacteria following transformation with the obtained plasmids. Bacteria were then pelleted by centrifugation and lysed using a microfluidizer M-110L (Microfluidics, EUA). Protein purification was performed using an FPLC system (Fast Performance Liquid Chromatography, GE Healthcare) with HisTrap Chelating columns, and purified TcKAP7 was analyzed by SDS-PAGE. Purified recombinant TcKAP7 was inoculated into BALB/c mice for immunization, with serum collected for subsequent analysis. Antigen was emulsified with Freund's adjuvant for the initial inoculation and with Alu-GelS (SERVA) for subsequent doses. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the guide for animal use of the Fiocruz and the protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation (LW-52/19).

### **2.4 TcKAP7 deletion cassette construction**

Primers targeting the 5' upstream and 3' downstream regions of TcKAP7 were designed for its deletion. Amplicons were purified, digested, and cloned into a neomycin gene vector, yielding plasmid pNEO1KAP7. To target the second allele in diploid *Trypanosoma cruzi*, novel primers were designed, and the neomycin gene in pNEO1KAP7 was replaced with a hygromycin gene, resulting in pHIGRO1KAP7. Double-resistant parasites lacking functional TcKAP7 alleles were generated via double selection with G418 and hygromycin (500  $\mu$ g/L) after reintroduction of pHIGRO1KAP7. Positive selection was confirmed by absence of viable cells in control groups. Validation of resistance gene presence was performed via PCR using DNA from the resulting TcKAP7 KO neo:higro population.

### **2.5 *T. cruzi* transfection**

Epimastigote forms of *T. cruzi* at a cellular density of  $3 \times 10^7$  cells/mL were transfected by electroporation. Approximately a total of  $1 \times 10^9$  cells were collected by centrifugation (4.000 x g, 4°C) and resuspended in 2mL of electroporation buffer (20 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10

mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl, pH 7.6). Cells (400 µL) were combined with 20 µg of the plasmid of interest. For the negative control, parasites were subjected to the same conditions but electroporation buffer was used instead of DNA. The mixtures were placed into pre-chilled electroporation cuvettes (Bio-Rad, 0,2 mm gap) and incubated on ice for 10 minutes. Transfection was carried out using two successive pulses of 500 µF and 450 volts with a Bio-Rad Genepulser® apparatus. Post-transfection, the cells were incubated on ice for 5 minutes and then transferred to 10mL of LIT medium containing antibiotics for selection. The cultures were monitored weekly until no viable cells were detected in the negative control.

## **2.6 Immunofluorescence microscopy**

*T. cruzi* epimastigote cells were harvested by centrifugation (4.000 x g, 3 minutes, 10°C) washed twice in PBS and then deposited onto poly-L-lysine-coated glass slides. The parasites were fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% diluted in PBS. Following fixation, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 2 minutes at room temperature and then incubated overnight with blocking solution (BSA 1% in PBS). The parasites were subsequently incubated for one hour with the appropriate primary antibody (1:1000) for protein localization. After washing five times with PBS, cells were incubated with mouse anti-IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:600 dilution in blocking solution) for one hour. The cells were then washed 5 times with PBS. DNA was detected by staining with Hoeschst 33342 (Invitrogen, 2 µg/µL) for five minutes, followed by five washes with PBS. The cells were mounted using ProLong Gold Antifade (Invitrogen). Image acquisition was performed using Leica SP5 and DMI6000 microscopes.

## **2.7 Transmission electron microscopy**

*T. cruzi* cells were harvested and washed three times with PBS. Then, samples were fixed in a solution containing 2,5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and cacodylate buffer (0.1M, pH 7,2). Subsequently, cells were fixed for one hour in a solution containing 1% of osmium tetroxide and 0.8% of potassium ferrocyanide. Later on, cells were washed in cacodylate buffer and dehydrated in a graded series of acetone solutions (50%, 70%, 90%, and two exchanges of 100% acetone) for 10 min at each step. After embedding in Polybed resin, the ultrathin sections were stained with 5% uranyl acetate for 45 min and lead citrate for 5 min. Samples were observed in a Tecnai™ Spirit TEM transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## 2.8 Protein extracts and western blot analysis

*T. cruzi* epimastigotes in exponential growth phase were used to prepare protein extracts. Cells were harvested at the time points indicated in each experiment and, for the experiment to determine the knockout of TcKAP7, none of the cell were treated. Parasites were washed and resuspended in 200  $\mu$ L of SDS gel-loading buffer [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol]. Lysis was performed by sonication (5 cycles of 20 seconds ON, interspersed with 5 cycles of 20 seconds OFF; amplitude of 30%) using the Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific). The lysates were then boiled for 10 minutes to generate the total extract. Protein concentration was estimated using Bradford reagent and measured with an iMark Microplate Reader (BioRad) at 595 nm. For quantification, 20  $\mu$ L of each sample was mixed with 50  $\mu$ L of Bradford reagent and 130  $\mu$ L of Milli-Q water. A standard curve was generated using a serial dilution of a 10 mg/mL BSA solution to a final concentration of 0.625 mg/mL.

For western blot analysis, proteins were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel. Each sample (20  $\mu$ g, determined by Bradford assay) was loaded onto the gel, and electrophoresis was performed at 120V for 2 hours in Tris-Glycine buffer (25 mM Tris-HCl, 250 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). The gel was then incubated in transfer buffer (30 mM glycine, 48 mM Tris-HCl, 0.037% SDS, 20% methanol), and proteins were transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare), pre-activated with methanol for 3 minutes, using the Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) at 300 mA for 1 hour. Membranes were blocked in 4% powdered milk and washed in TBST buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% Tween 20, pH 7.5). They were incubated overnight with TcKAP7 primary antibody (1:2000 dilution), then washed in TBST for 10 minutes and incubated with anti-mouse IgG peroxidase secondary antibody (1:10,000) for 1 hour. Images were acquired using the ImageQuant LAS 500 system.

## 2.9 RNA extraction

RNA from  $1 \times 10^7$  cells was isolated using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was confirmed by running total RNA samples on a denaturing 1% agarose gel electrophoresis containing formamide. Samples were treated twice with the TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, #AM19707) according to the manufacturer's protocol. Residual genomic DNA was checked by normal PCR. RNA quantification was performed using the Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, #Q10210). For cDNA synthesis, 2

µg of DNA-free RNA was used with the GoScript™ Reverse Transcription System kit (Promega, #A5003) following the manufacturer's instructions.

### **2.10 Transcript level measurement by real-time qPCR.**

Transcript levels were measured using the  $2^{\Delta\Delta Ct}$  method, comparing treated and untreated cells. PCR assay efficiency was calculated using primers listed in Table 1, with only primer sets having efficiency between 90% and 110% included in subsequent analyses. Each reaction was performed in a 10 µL volume, consisting of 5 µL GreenMaster HighRox with UNG (Cellco, #PCK-105L), 1 µL of each primer (forward and reverse), 2 µL of cDNA, and 1 µL of nuclease-free water. Reactions were conducted in the CFX96™ Real-Time PCR Detection System using UltraCruz® PCR 96-well plates. Fold changes were calculated using the  $2^{\Delta\Delta Ct}$  method, and data were analyzed with GraphPad Prism (9.4.0) software.

### **2.11 DNA damage quantification by long-range PCR**

Parasite cultures at  $1 \times 10^7$  cells/mL were treated with specified drug doses, then harvested by centrifugation at 3000 x g for 10 minutes at designated time points. DNA from treated and untreated cells was extracted using the QIAGEN QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, cat: 51104). Quantitative PCR amplification and data analysis followed the methodology [33]. To estimate lesion numbers, DNA was diluted and quantified using the Quant-iT™ PicoGreen™ reagent (ThermoFisher, cat: P7589) in the Synergy 2 plate fluorometer (Biotek) until a concentration of 3 ng was achieved (with a 5% error margin). Lesion estimation involved comparing the amplification of a long DNA fragment between treated and untreated controls, normalized with a blank reaction. Primer details are provided in Table 1.

A long mitochondrial fragment (~10 kb) was amplified using primers qPCRMitF and qPCRMitR, while a short fragment (~250 bp) was used as an internal control for normalization, amplified with primers qPCRMitSmF and qPCRMitR. Reactions were performed using PrimeSTAR GXL (TakaraBio, cat R050A) with the following reagents per 50 µL reaction: 10 µL of 5× buffer, 4 µL of dNTPs (2.5 mM each), 2 µL of each primer (10 µM stock), 0.5 µL of PrimeSTAR GXL polymerase, 1 µL of diluted DNA (3 ng per reaction), and 30.5 µL of water. DNA amplification followed the manufacturer's protocol, adjusting the number of cycles to remain in the exponential phase. This was determined by comparing a control with 50% untreated DNA to a reaction with the appropriate amount of 100% untreated DNA, targeting 40%-60% amplification product.

All samples (treated and untreated) were amplified using this cycle number, with 1  $\mu$ L of water added to blank reactions. Post-PCR, samples were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen™ protocol. Lesion numbers were estimated by subtracting blank reaction values from concentration quantifications, normalizing long fragment amplifications to short fragments. Relative amplification values (treated/untreated samples) were calculated, and lesion numbers per 10 kb were estimated using the formula  $-\ln(\text{relative amplification})$ , assuming a Poisson distribution. Data presented are based on technical triplicates from biological triplicates for each strain and treatment.

### 2.11 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism (9.4.0) software. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All experiments accessing parasite survival and proliferation were conducted in biological triplicate.

## 3. RESULTS

### 3.1 The ablation of TcKAP7 has no discernible effect on cellular growth or morphology

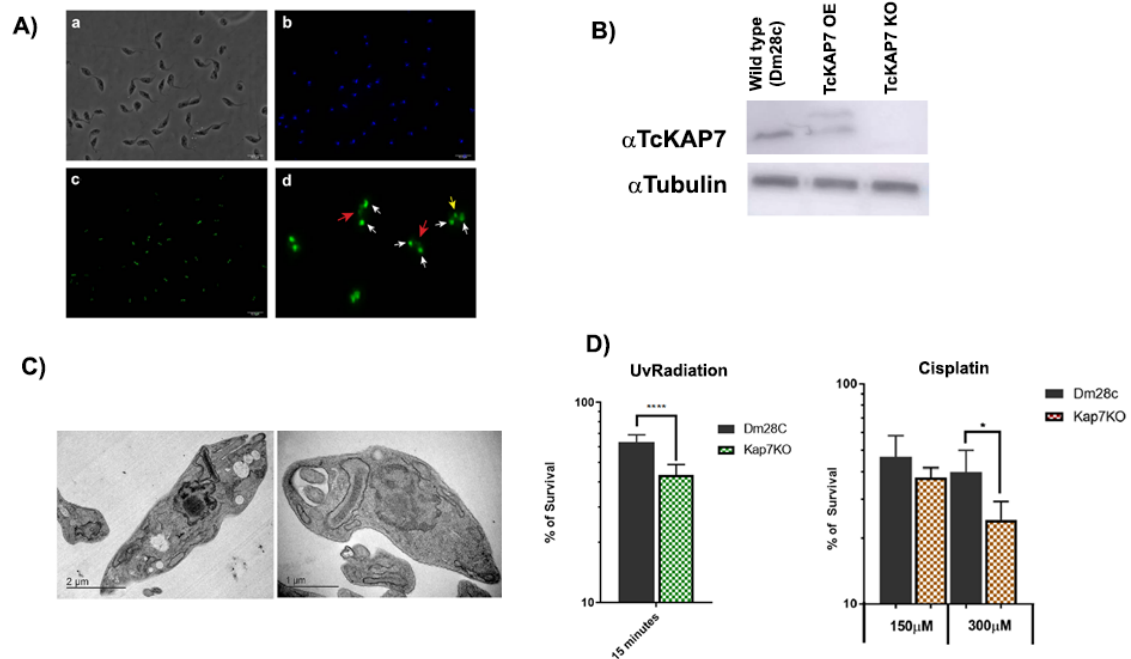
KAP proteins, characterized as H1 histone-like proteins [43], have been associated with diverse functions in the kDNA metabolism. Sequence analysis of TcKAP7 reveals a notably low degree of similarity with any homologous proteins in *T. brucei* strains 427 and 927. TcKAP7 is predicted to have 27 kDa and consists of 336 amino acids. Domain analysis using pFAM tool has identified a single functional HMG (High-mobility group) domain within its C-terminal domain, suggesting a potential involvement in DNA and RNA metabolism. Immunofluorescence microscopy employing antibodies against TcKAP7 in a TcKAP7 overexpressor strain highlights the protein's localization within the kDNA disk (red arrowhead) and antipodal sites (white arrowheads) (Figure 1A). Additionally, occasional localization of TcKAP7 is observed slightly above the kDNA disk, within a region called kinetoflagellar zone (KFZ – yellow arrowhead). Taken together, these findings suggest a potential association between TcKAP7 kDNA metabolism in *T. cruzi*.

### 3.2 Parasites lacking TcKAP7 are sensitive to UV radiation and cisplatin damage

To elucidate the role of TcKAP7 in *T. cruzi* metabolism, cells lacking TcKAP7 were generated (Figure 1B). Despite the ablation of TcKAP7 expression, the parasite's growth remained unaffected compared to wild-type (WT) cells, and no discernible differences in the

structure of the kDNA disc were observed using transmission electron microscopy (Figure 1C), indicating that this protein is not essential to the parasite's proliferation.

Given the implications of our earlier findings suggesting a role for TcKAP7 in kDNA metabolism, our subsequent investigation focused on assessing the response of the knockout parasite to DNA-damaging agents. Initially, *T. cruzi* was exposed to UV radiation (Figure 1D, left panel). Notably, the TcKAP7 knockout exhibited heightened sensitivity immediately following exposure (15 minutes post-exposure) compared to the WT strain. Similarly, upon treatment with 300  $\mu$ M of cisplatin, the knockout strain displayed increased sensitivity relative to the WT strain within the first hour post-exposure (Figure 1D, right panel). However, this heightened sensitivity was not evident following treatment with 150  $\mu$ M of the drug. These findings suggest the significance of DNA damage within the kinetoplast of *T. cruzi*, with survival outcomes contingent upon the extent of damage inflicted upon the kDNA.



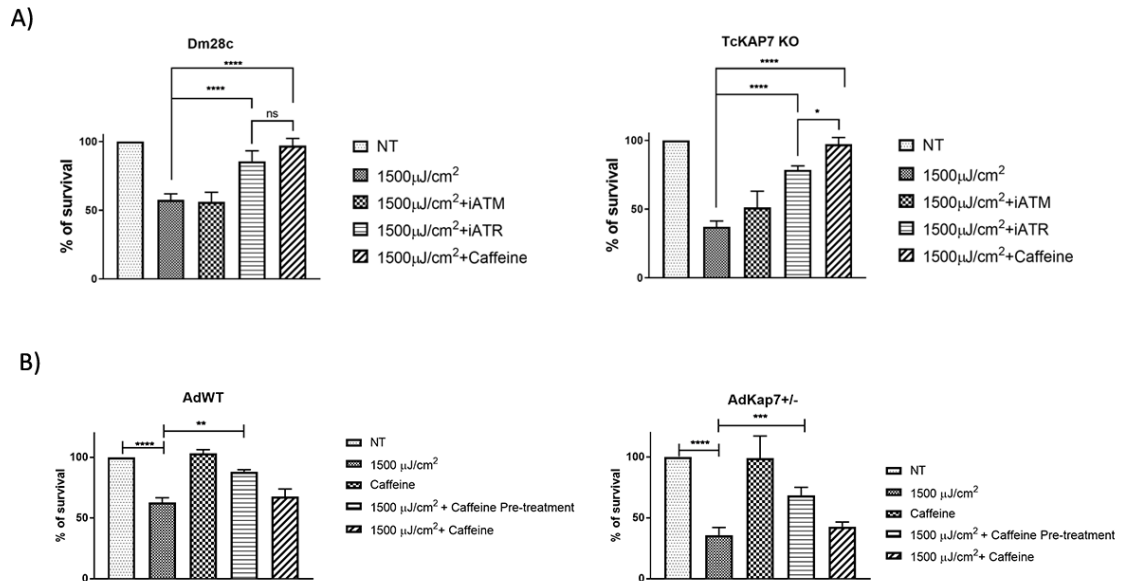
**Figure 1 – TcKap7 mutant is sensitive to UV radiation and cisplatin** – **A)** Fluorescence microscopy of strain expressing a FLAG tagged version of TcKAP7 without any treatment with DNA damaging agent. TcKAP7 is located in the kDNA disc of most parasites in normal conditions. Red arrowheads: kDNA disc TcKAP7; yellow arrowheads: kinetoflagellar zone TcKAP7; white arrowheads: antipodal sites. **B)** Western blot analysis of wild type strain (Lane 1) overexpressor TcKAP7 strain modified with FLAG tag (Lane 2) and double mutant for TcKAP7 (Lane 3). **C)** Electron microscopy of TcKAP7 knockout cells showing that no visual dearrangement of the kDNA structure is found on the kDNA disc of mutant cells. **D)** Survival curves of TcKAP7 knockout cells after exposure to 1500J/m<sup>2</sup> of UV radiation (left panel) and 150 $\mu$ M and 300 $\mu$ M of cisplatin (right panel). Experiments done in three biological replicates, (\*P<0.05, student t-test).

### 3.3 The cell death caused by UV radiation is reversible in WT and knockout parasites

As demonstrated in Figure 1D, treatment with UV radiation results in rapid cell death in both WT and knockout strains. This observation led us to hypothesize that a cellular signaling pathway might be involved in this response. It has been established that ATM and ATR are two major kinases essential for the DNA damage response following UV radiation exposure [44]. To investigate whether the observed cell death at the initial time point is mediated through ATM and ATR pathways, we pre-treated the cells with an ATM inhibitor (KU55933 – Skellchem, cat. S1092), an ATR inhibitor (Ve821 – Skellchem, cat. S8007), and caffeine, a non-specific inhibitor of both signaling pathways [45–47], before subjecting them to UV radiation-induced DNA damage.

As shown in Figure 2A, pre-treatment with the ATR inhibitor increased the survival of both cell types (fourth bar in the graphs in Figure 2A) compared to the respective irradiated strains without pre-treatment. Caffeine pre-treatment significantly enhanced the survival of both mutant and WT cells (values presented in Table 2). Notably, while no significant difference was observed between the ATR inhibitor and caffeine pre-treated populations in the WT strain, a statistical difference was observed in the double knockout, suggesting that other signaling pathways may be activated in the knockout (last two bars in Figure 2A). These results indicate that in *T. cruzi*, UV radiation-induced cell death is mediated by the ATR pathway, and other pathways may also be involved in mitochondrial DNA damage.

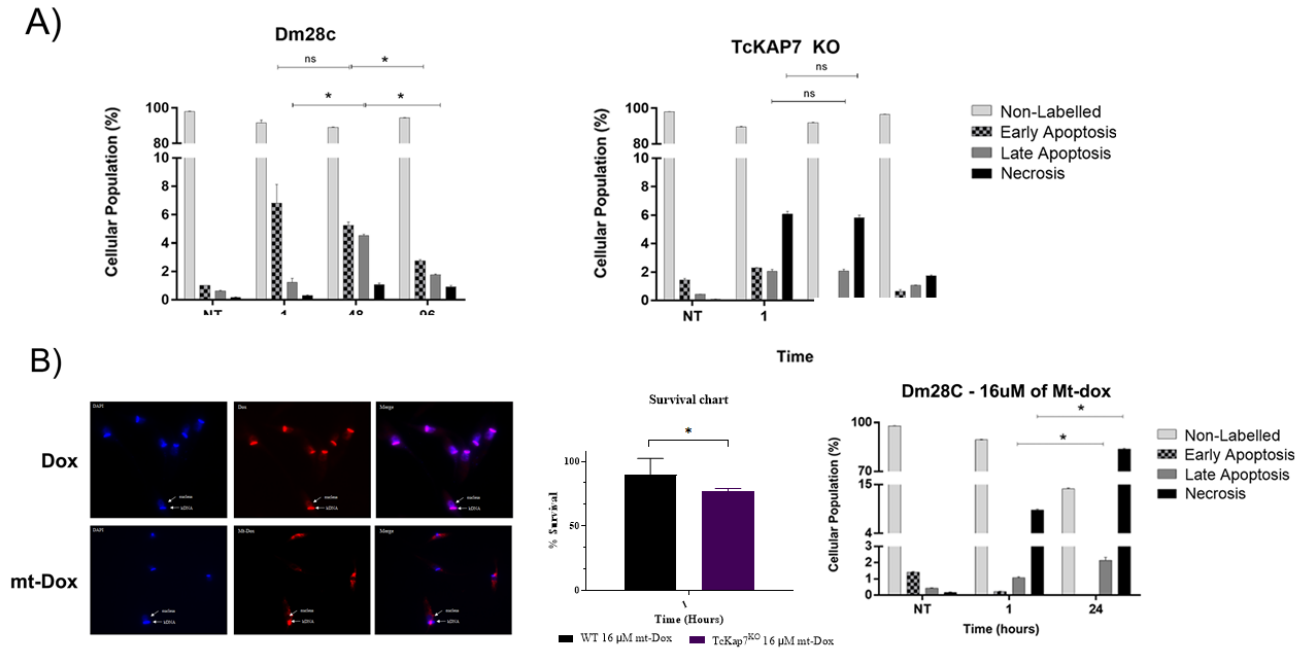
A similar phenotype was observed with caffeine treatment in *Angomonas deanei*. Pre-treatment with caffeine prior to UV radiation exposure rescued cells from the rapid death observed in untreated cells (Figure 2B). This suggests that the rapid death caused by UV radiation in both organisms is related to a signaling pathway and cellular burst.



**Figure 2 – Survival of cells exposed to UV radiation after pre-treatment with caffeine, ATM or ATR inhibitors – A)** Survival of Dm28c WT (left panel) and TcKAP7 knockout (right panel) strains 15 minutes after being exposed to 1500  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  of UV radiation after pre-treatment with caffeine, ATM inhibitor or ATR inhibitor. All the values of the graph are in the Table 1. **B)** Survival of wild type and AdKAP7 mutants for *Angomonas deanei* cells to UV radiation before and after treatment with caffeine. Cells were counted 15 minutes after UV radiation and treated prior and after this exposure with caffeine.

Annexin V and propidium iodide staining showed that the type of cell death differs between mutant and WT cells depending on the treatment and cell strain. Upon UV irradiation, WT cells exhibited staining indicative of an apoptotic process at all time points analyzed (Figure 3A, left panel). In contrast, TcKAP7 knockouts displayed a shift in the signal, suggesting a non-apoptotic cell death pathway (Figure 3A, right panel). To determine if similar results were observed with kDNA damage, we used mt-DOX, a modified version of doxorubicin targeted to the mitochondria. As shown in Figure 3B, left panel, mt-DOX localized outside the parasite's nucleus, indicating that it does not damage the nuclear DNA of *T. cruzi*. As shown in Figure 3B (middle panel), TcKAP7 knockout cells exhibited increased sensitivity to mt-DOX treatment, with a survival rate of 76.69% compared to 90.02% in wild-type cells immediately after treatment. In contrast, when treated with DOX (Figure supplementary 1), no significant differences in survival were observed between TcKAP7 knockout and wild-type cells one hour post-treatment. After treatment, a non-apoptotic signal was observed, differing from what is seen in mammalian cells [48] (Figure 3B, right panel). Collectively, these results suggest that

the rapid cell death following treatment is signaled by the mitochondria in a manner distinct from nuclear signaling.



**Figure 3 – Annexin and propidium iodide staining of mutant and WT strains after treatment with UV radiation and mt-DOX – A)** Dm28c (left panel) and TcKAP7 knockout cells (right panel) were treated with UV radiation to verify the cell death pattern after genotoxic treatment. Knockout of TcKAP7 changed the cell death profile in the first 48h of treatment. **B)** Fluorescence images of *T. cruzi* treated with 16µM mt-DOX and DOX (left panel), in red. White arrows indicate the position of the nucleus and kDNA with DOX and Mt-DOX. Genomic DNA and kDNA were labeled with 10µM DAPI, in blue. Scale bar = 100 µm. Survival graph after exposure to 16µM mt-DOX in WT and TcKAP7KO cells for 1h and after treatment (middle panel), where it was possible to observe sensitivity in TcKAP7KO cells (\* $P > 0.05$ , student t test). On right annexin and propidium iodide assay of *T. cruzi* WT cells treated with 32 µM mt-DOX (right panel). Cells were followed 1 hour and 24 hours after treatment. A significant increase was observed on a necrosis like staining with the increase of time on those cells.

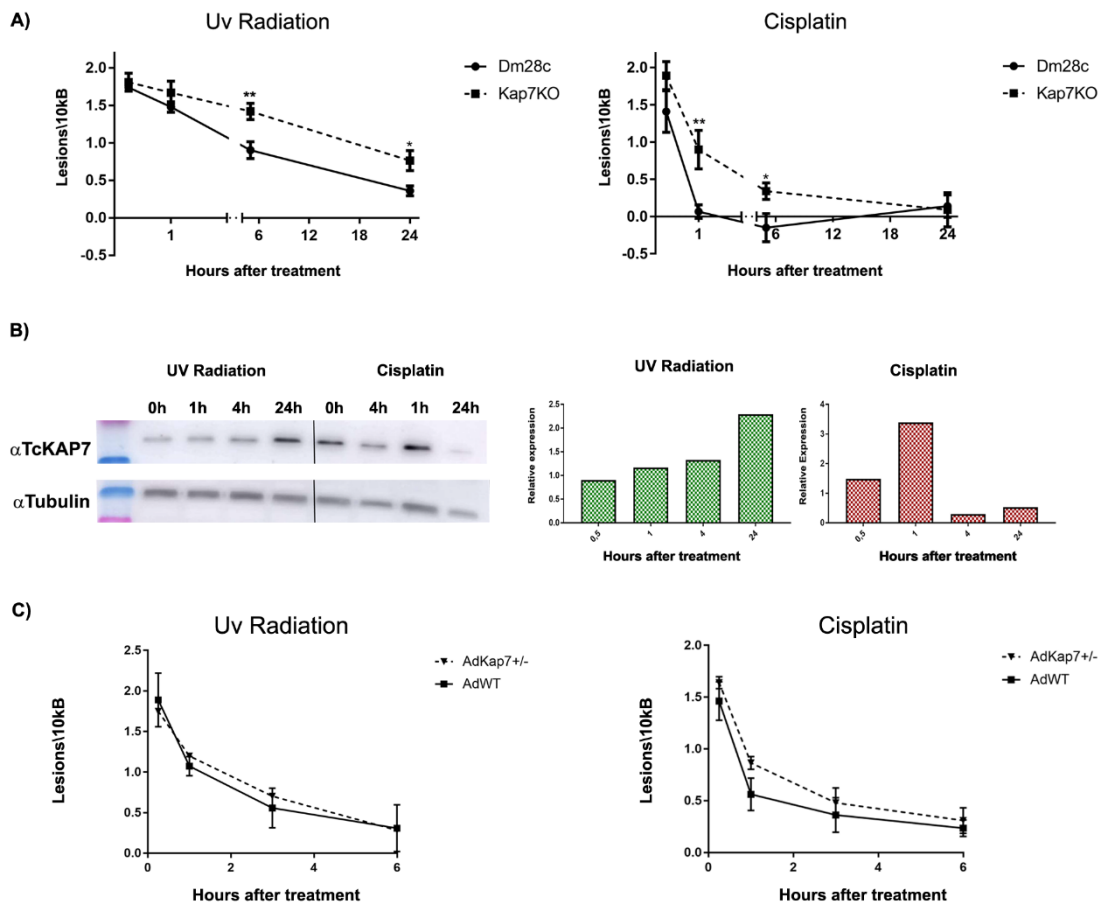
### 3.4 UV radiation and cisplatin treatment alter TcKAP7 expression levels.

Given that cells lacking TcKAP7 exhibit increased sensitivity to cell death, we next investigated the expression levels of TcKAP7 and the number of lesions generated by UV and cisplatin treatments. To quantify DNA damage in the kDNA of *T. cruzi* and assess DNA repair kinetics in both strains, we employed a qPCR-based assay following treatment with each genotoxic agent. As shown in Figure 4A, both UV radiation and cisplatin cause DNA damage in the kDNA of *T. cruzi*. No significant differences in the initial levels of damage were observed

between the strains at the first time point for either treatment. For UV treatment (Figure 4A, left panel), the number of lesions per 10 kb decreased steadily over 24 hours.

A similar pattern was observed following cisplatin treatment. After one hour, WT cells showed a marked decrease in kDNA damage, indicating rapid repair. Although a decrease was also noted in the knockout cells, the damage levels remained significantly higher than in WT cells at this time point. In the mutants, damage levels became undetectable only after 6 hours. Expression analysis revealed that in WT strain, TcKAP7 expression peaked 24 hours post-UV exposure and one hour post-cisplatin exposure, aligning with the observed repair kinetics (Figure 4B). This peak in expression corresponds with the time point showing the greatest reduction in damage levels.

In *A. deanei*, both WT and AdKAP7 mutant strains could resolve kDNA damage caused by both treatments, though the mutant strain was less efficient (Figure 4C). This suggests that KAP7, as in *T. cruzi*, is associated with the damage response process rather than directly involved in damage removal. Collectively, these results indicate that TcKAP7 plays a role in the mitochondrial DNA damage response, although it is not directly responsible for DNA damage removal, as parasites lacking the protein can still manage the damage. Furthermore, these findings demonstrate that the absence of TcKAP7 is linked to a rapid and initial response to kDNA damage.



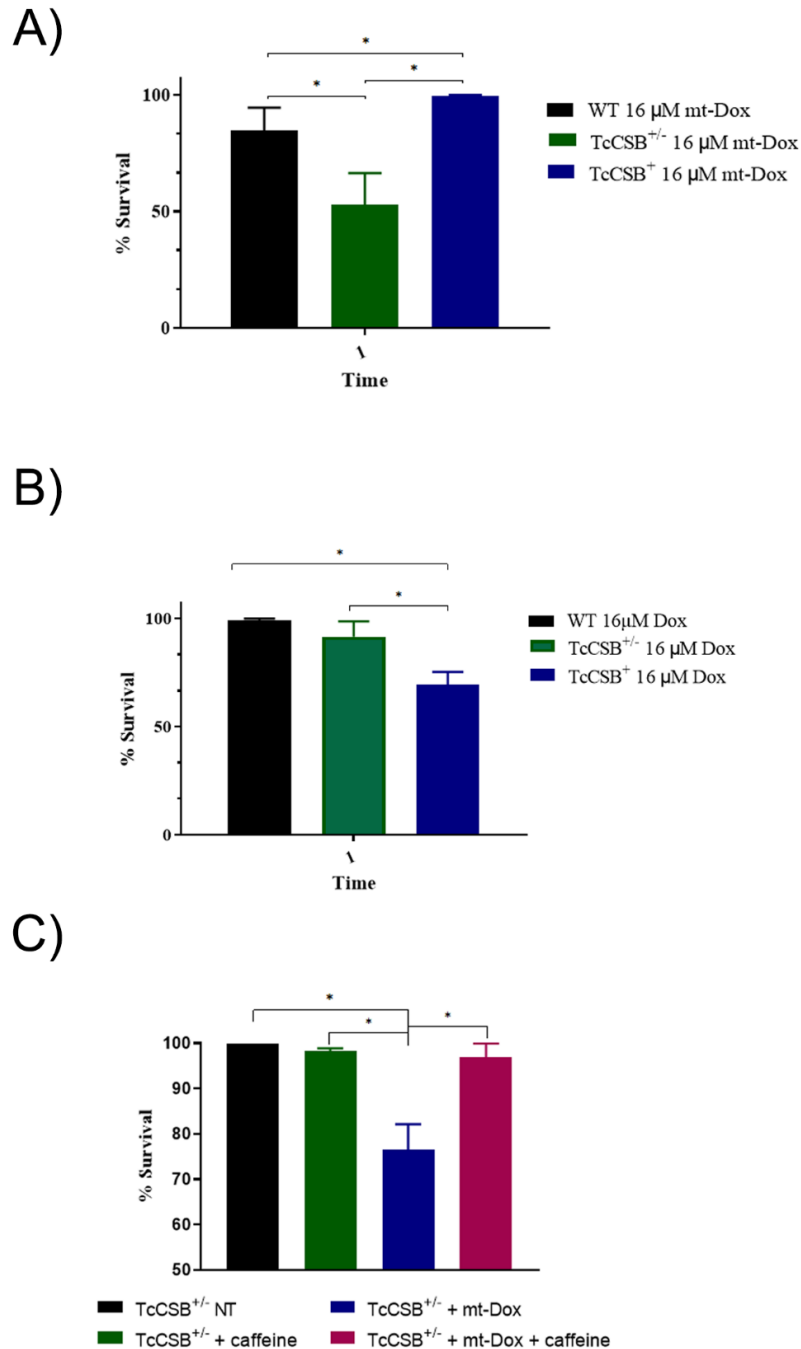
**Figure 4 – DNA repair kinetics and TcKAP7 expression pattern after generation of DNA damage** – **A)** DNA repair kinetics of mutant and WT *T. cruzi* cells after DNA damage generated by 1500J/m<sup>2</sup> of UV radiation (left panel) and 300uM of cisplatin (right panel) measured by long-range PCR. On both strains the level of damage generated on the first time point is similar, but mutant cells present a slower decrease in detected damages in comparison WT cells. A similar phenotype of slower decrease is also observed for cisplatin treatment, although after one hour of treatment both strains presented a fast decrease of detected lesions. **B)** Western blot of TcKAP7 on WT cells after treatment with genotoxic agents. Cisplatin presented a steady growth of expression after treatment in the first 24 hours. UV radiation peak of expression was observed after one hour of irradiation. **C)** DNA repair kinetics of mutant and WT *A. deanei* cells after DNA damage generated by 1500J/m<sup>2</sup> of UV radiation (left panel) and 300uM of cisplatin (right panel) measured by long-range PCR. As observed for *T. cruzi*, on both strains the level of damage generated on the first time point is similar, but mutant and WT cells present similar decrease over time on both treatments.

### 3.5 TResponse of TcCSB<sup>+/-</sup> and TcCSB<sup>+</sup> cells to DOX and mt-DOX

The rapid cell death and mechanisms of the DNA-damaging agents used in this study suggest that transcription plays a critical role in the cellular response. In this context, transcription-coupled repair (TCR) might be a key pathway, with the Cockayne syndrome protein B (CSB) being crucial for TCR [50,51]. To further investigate the involvement of TCR, we conducted experiments on TcCSB hemi-knockout cells (TcCSB<sup>+/-</sup>) and TcCSB-overexpressing cells (TcCSB<sup>+</sup>) developed in our lab (DNA repair submmited, DNAREP-D-23-00208R1).

Wild-type (WT), TcCSB hemi-knockout, and TcCSB-overexpressing cells were treated with 16  $\mu$ M mt-DOX. The results indicated that TcCSB<sup>+/-</sup> cells (Figure 5A) were more sensitive than WT cells in the first hour post-treatment, with survival rates of 53.00% and 81.82%, respectively. TcCSB-overexpressing cells exhibited a significantly higher survival rate of 99.50%. This data suggests that the absence of TcCSB is associated with increased sensitivity to mt-DOX in these mutant cells. When treated with 16  $\mu$ M doxorubicin lacking the mitochondrial targeting peptide, TcCSB<sup>+</sup> cells were more sensitive in the first hour post-treatment compared to WT cells, with survival rates of 69.35% and 91.60%, respectively (Figure 5B). In contrast, knockout cells displayed increased resistance one hour after treatment, with a survival rate of 99.00%. These findings indicate that TcCSB overexpression enhances cell survival when kDNA is damaged, suggesting a role for TcCSB in the mitochondrial damage response in *T. cruzi*.

Since CSB is involved in the recognition of stalled RNA polymerases at damage sites and we observed differential survival rates in TcCSB mutants following mt-DOX treatment, we investigated whether the cell death caused by mt-DOX is signaled. To explore the involvement of ATM and ATR kinases in the *T. cruzi* mtDNA double-strand break (DSB) response, we repeated the caffeine pre-treatment used for TcKAP7 mutants. TcCSB<sup>+/-</sup> cells were pre-treated with caffeine and then exposed to mt-DOX. Cells were counted one hour post-treatment. The results showed that mt-DOX-treated cells had a survival rate of 76.46% compared to untreated cells (Figure 5C). Pre-treatment with caffeine increased the survival rate to 96.90%. These findings suggest that the cell death induced by mt-DOX is signaled by kDNA damage and involves kinases that can be inhibited by caffeine.

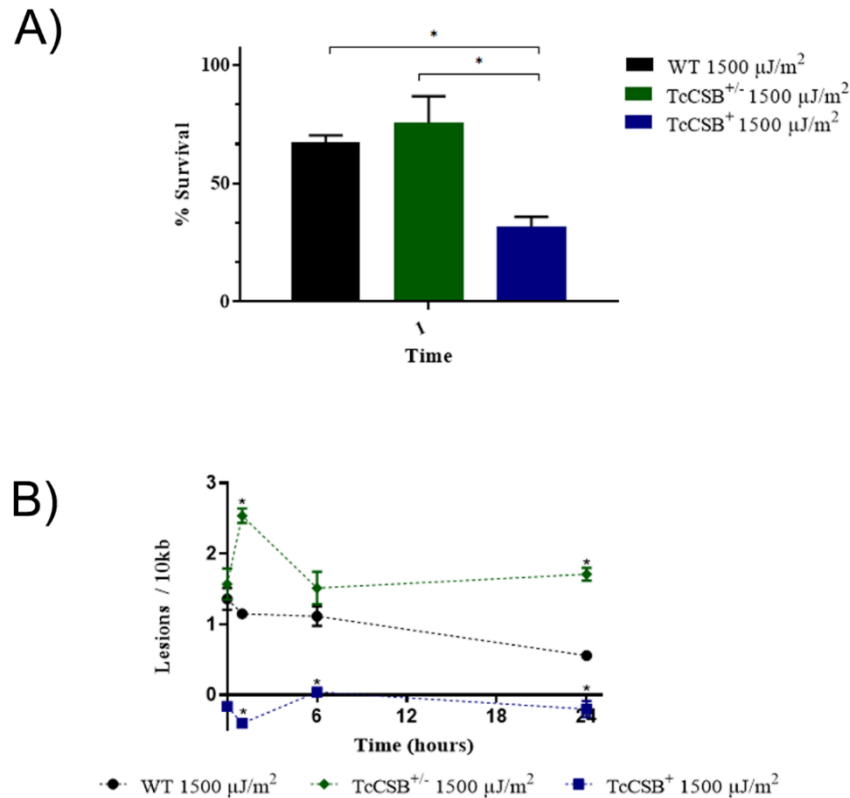


**Figure 5 – TcCSB and Cl Brener WT cells response to mt-DOX and DOX – A)** Survival graph after exposure to 16μM mt-DOX in WT, TcCSB<sup>-/+</sup> and TcCSB<sup>+</sup> cells, at 1h after treatment, showing lower survival in TcCSB<sup>-/+</sup> cells 1 hour after treatment and lower survival in TcCSB<sup>+</sup> cells) 24 hours after treatment (\*P<0.05, student t test). **B)** Survival graph after exposure to 16μM DOX in WT, TcCSB<sup>-/+</sup> and TcCSB<sup>+</sup> cells, at 1h and 24h after treatment, showing lower survival in TcCSB<sup>+</sup> cells 1 and 24 hours after treatment (\*P<0.05, student t-test). **C)** *T. cruzi* cells were pre-treated for 1 hour with 2mM Caffeine (non-specific ATM/ATR inhibitor). At the end of the incubation period they were treated with mt-DOX. In black, untreated TcCSB<sup>+/-</sup> cells. In green TcCSB<sup>+/-</sup> cells treated only with caffeine, in blue TcCSB<sup>+/-</sup> cells treated only with mt-DOX and in wine TcCSB<sup>+/-</sup> cells pre-treated with caffeine and treated with 16uM mt-DOX. The graph shows that caffeine reversed the death caused by mt-DOX.

### **3.6 Hemi-knockout cells initially exhibit greater resistance to UV radiation but accumulate more kDNA damage**

Ultraviolet (UV) radiation, a genotoxic agent, induces lesions in both the mitochondrial and nuclear genomes, leading to the activation of transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER) [52]. To elucidate the role of TcCSB in kDNA repair, we exposed WT, TcCSB hemi-knockout (TcCSB<sup>+/-</sup>), and TcCSB-overexpressing (TcCSB<sup>+</sup>) cells to 1500 J/m<sup>2</sup> of UVC radiation. One hour post-treatment, TcCSB<sup>+/-</sup> and WT cells exhibited a survival rate of 67.42%, demonstrating higher resistance compared to TcCSB<sup>+</sup> cells, which had a survival rate of 31.90% (Figure 6A).

To quantify kDNA damage levels, we employed long-range PCR in WT, TcCSB<sup>+/-</sup>, and TcCSB<sup>+</sup> cells. WT cells showed a slight decrease in lesions within the first hour, stabilization from 1 to 6 hours, and a subsequent reduction between 6 and 24 hours (Figure 6B). In contrast, TcCSB<sup>+/-</sup> cells exhibited an increase in lesions after 1 hour, a slight decrease up to 6 hours, and then stabilization until 24 hours (Figure 6B). Interestingly, TcCSB<sup>+</sup> cells did not show detectable kDNA lesions. These results suggest that *T. cruzi* cells can resolve kDNA damage caused by UV radiation in the mitochondrial genome, with TcCSB-overexpressing cells demonstrating higher DNA repair efficiency. Conversely, the deficiency of TcCSB in hemi-knockout cells impairs the repair of UV-induced lesions.

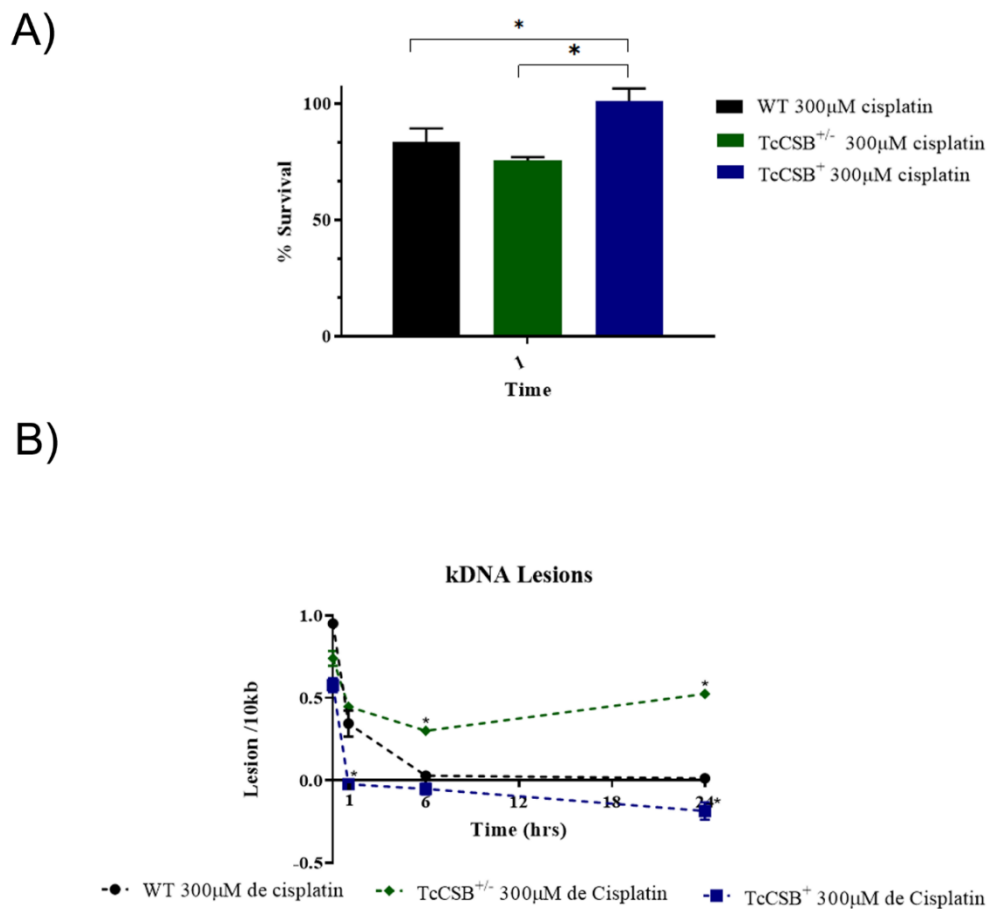


**Figure 6 - TcCSB and Cl Brener WT cells response response to 1500 J/m<sup>2</sup> UV-C radiation. A)** Graph of survival after exposure in WT, TcCSB<sup>+/-</sup> and TcCSB<sup>+</sup> cells, at 1h and 24h after treatment with 1500 J/m<sup>2</sup> of UV-C, showing lower survival in TcCSB<sup>+</sup> 1 cells and TcCSB<sup>+/-</sup> cells 24 hours after treatment (\*P<0.05, student t test). **B)** Kinetics of repair caused by treatment with 1500 J/m<sup>2</sup> of UV-C radiation in the mitochondria of wild-type cells (Wt) and Heminocaute cells (CSB<sup>+/-</sup>) and CSB overexpressors (CSB<sup>+</sup>), measurements were made immediately after (15 minutes), 1 hour, 6 hours and 24 hours after treatment. Mitochondrial repair kinetics, dotted lines Wt in black and CSB<sup>+/-</sup> in green and CSB<sup>+</sup> in blue. CSB<sup>+</sup> and CSB<sup>+/-</sup> cells have their mitochondrial repair kinetics altered compared to WT. (\* P<0.05, student t test).

### 3.7 CSB-overexpressing cells exhibit increased resistance to cisplatin and enhanced kDNA repair

To investigate the role of CSB in kDNA repair, we treated WT, TcCSB<sup>+/-</sup>, and TcCSB<sup>+</sup> cells with 300  $\mu\text{M}$  cisplatin (Figure 7A). One hour post-treatment, WT and TcCSB<sup>+/-</sup> cells showed survival rates of 83.35% and 75.54%, respectively, whereas TcCSB<sup>+</sup> cells exhibited a survival rate of 100%. Similar to UV radiation, cisplatin induces lesions in both the mitochondrial and nuclear genomes, as observed in Figure 4A. We quantified kDNA damage in WT, TcCSB<sup>+/-</sup>, and TcCSB<sup>+</sup> cells. In WT cells, there was a rapid reduction in the number of lesions within the first hour post-treatment, with all lesions disappearing by 6 hours (Figure

7B). In TcCSB<sup>+/-</sup> cells, although a decrease in lesions was observed in the first hour, it was not as pronounced as in WT cells. A slight reduction in the number of lesions was noted at 6 hours, followed by an increase in lesions from 6 to 24 hours. In TcCSB<sup>+</sup> cells, all lesions were repaired within the first hour, and no further lesions were detected. These data suggest that TcCSB plays a crucial role in repairing kDNA lesions generated by cisplatin.



**Figure 7 - TcCSB and Cl Brener WT cells response response to 300µM of cisplatin. A)** Survival graph on exposure to 300µM cisplatin in wild-type *T.cruzi* epimastigote cells (WT) in black, TcCSB single knockout (TcCSB<sup>-/+</sup>) in green and TcCSB overexpressor (TcCSB<sup>+</sup>) in blue, within 1h after treatment TcCSB<sup>+/-</sup> cells show lower survival than WT and TcCSB<sup>+</sup> cells (\*P<0.05, student t test). **B).** Kinetics of repair after treatment with 300 µM cisplatin in the mitochondria of wild-type cells (Wt) and Heminocaute cells (CSB<sup>+/-</sup>) and CSB overexpressors (CSB<sup>+</sup>), measurements were made immediately after (15 minutes), 1 hour, 6 hours and 24 hours after treatment. Mitochondrial repair kinetics, dotted lines Wt in black and CSB<sup>+/-</sup> in green and CSB<sup>+</sup> in blue. CSB<sup>+</sup> and CSB<sup>+/-</sup> cells have their mitochondrial repair kinetics altered compared to WT. (\* P<0.05, student t test).

### **3.8 TcCSB Deficiency reduces mitochondrial transcript levels following cisplatin treatment**

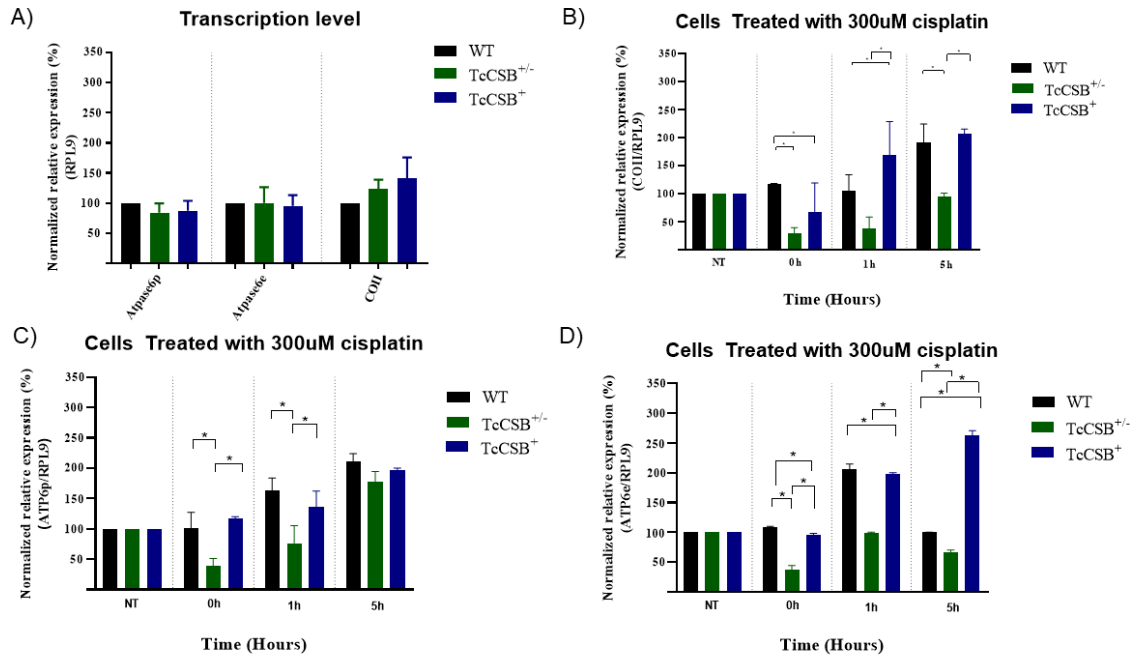
The evidence indicates that TcCSB is involved in repairing bulky lesions in the mitochondria of *T. cruzi*. To investigate whether this is related to transcription-coupled processes, such as TC-NER, we evaluated the transcript levels of several mitochondrial genes using real-time PCR under both basal and cisplatin stress conditions. Under basal conditions, the transcript levels of pre-mRNA (ATP6p) and the mature mRNA of the ATP6 gene (ATP6e) and COII did not differ significantly between cells (Figure 8A).

Following treatment with 300  $\mu$ M cisplatin, the transcript levels for COII (Figure 8B) changed immediately. In TcCSB<sup>+/-</sup> cells, relative transcript levels dropped to 29.01%, while in TcCSB<sup>+</sup> cells, they dropped to 67.50% compared to WT cells. After one hour of treatment, transcript levels in TcCSB<sup>+</sup> cells rose to 168.00%, whereas in TcCSB<sup>+/-</sup> cells, they remained at 37.50% relative to WT cells. Five hours post-treatment, WT cells increased transcription to 190.50%, and TcCSB<sup>+</sup> cells reached 207.10% of COII transcript levels compared to untreated WT controls. Meanwhile, TcCSB<sup>+/-</sup> cells showed a slight increase in transcript levels, maintaining them at the same level as the untreated WT control (Figure 8B).

To determine whether cisplatin-induced lesions also affect the transcript levels of genes edited in the mitochondria, we assessed pre-mRNA (ATP6p) and edited mRNA for ATP6 (ATP6e). For pre-mRNA (ATP6p), no significant differences were observed between WT and TcCSB<sup>+</sup> strains at any time point (Figure 8C). However, TcCSB<sup>+/-</sup> cells exhibited a 39.12% drop immediately after treatment. One hour post-treatment, TcCSB<sup>+/-</sup> cells maintained low transcript levels at 76.50%. Five hours post-treatment, transcript levels in TcCSB<sup>+/-</sup> cells increased to 177.04%, with no significant differences compared to WT (211.33%) and TcCSB<sup>+</sup> cells (197.10%).

For edited mRNA (ATP6e) (Figure 8D), immediately after treatment, TcCSB<sup>+/-</sup> cells had a 37.16% decrease in transcript levels, which was not observed in TcCSB<sup>+</sup> (95.50%) and WT cells (100.81%). One hour post-stress, TcCSB<sup>+</sup> and WT cells showed an increase in transcripts to 205.66% and 198.22%, respectively, while TcCSB<sup>+/-</sup> cells had transcript levels of 98.50%. Five hours post-stress, TcCSB<sup>+</sup> cells maintained high transcript levels at around 262.50%, while WT cells showed 99.50%, and TcCSB<sup>+/-</sup> cells showed 67.00%. These data

collectively indicate that TcCSB deficiency negatively impacts mitochondrial transcript levels in *T. cruzi* following cisplatin treatment.



**Figure 8 - Change in the number of mitochondrial transcripts after stress with 300µM cisplatin in TcCSB and Cl Brener WT overexpressor and heminocaute cells - A)** Number of transcripts in culture conditions of mitochondrial genes, in wild-type cells (WT) in black, CSB heminocautes (TcCSB<sup>+/-</sup>) in green and CSB overexpressors (TcCSB<sup>+</sup>) in blue. The transcripts are: Subunit 2 of cytochrome C oxidase (COII), subunit 6 of ATP Synthase (ATP6e and ATP6p). **B)** Number of transcripts under stress conditions with 300 µM cisplatin at 0h, 1h and 5h hours after treatment WT cells in black, TcCSB<sup>+/-</sup> cells in green and TcCSB<sup>+</sup> cells in blue, all targets were normalized with RPL9. **A.** Number of COII gene transcripts shows a greater decrease in TcCSB<sup>+/-</sup> cells. **C)** Number of transcripts for the pre-mRNA of the ATP6 gene, shows a greater drop in TcCSB<sup>+/-</sup> cells at times 0h and 1h. **D)** Number of transcripts for the mature mRNA of the ATP6 gene, shows a greater decrease in TcCSB<sup>+/-</sup> cells. Experiments done in two biological replicates. (\*P<0.05, student t-test).

#### 4. DISCUSSION

Research in DNA repair has traditionally centered on the nuclear DNA machinery. The understanding of mitochondrial DNA (mtDNA) repair mechanisms has been overshadowed by observations indicating the limited repair capacity of human mitochondria, coupled with mitophagy and other compensatory mechanisms for managing damaged mtDNA [7,53]. Consequently, the prevailing notion suggests the absence of a significant repair pathway within

this organelle. However, the distinctive structure of the kinetoplast in trypanosomatids positions these organisms as valuable models for investigating the mtDNA damage response.

Kinetoplast-associated proteins (KAPs) constitute a class of proteins specific to trypanosomatids and are integral to kinetoplast metabolism. Described as histone-like proteins, studies involving KAPs from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* have implicated these proteins in transcriptional regulation and kDNA organization. Knockout of CfKAP2 and CfKAP3 in *Crithidia fasciculata* resulted in increased expression of maxicircle genes [27,54], while knockdown of TbKAP6 in *Trypanosoma brucei* led to kinetoplast loss [28], reminiscent of effects observed with berenil treatment, a specific mitochondrial drug known to induce replication problems in *T. cruzi* [55,56].

Our experiments demonstrated the involvement of TcKAP7 in the UV and cisplatin response in *T. cruzi* (Figure 1). Notably, rapid cell death was evident shortly after UV radiation, a phenotype mirrored in mitochondria-targeted doxorubicin treatments. Cisplatin adducts are known to induce significant distortion of DNA strands [57,58], while UV radiation generates CPDs and 6,4PPs, both highly disruptive [53]. Doxorubicin and its mitochondria-targeted variant interfere with replication and transcription by intercalating DNA strands [48,49], suggesting a potential role for TcKAP7 in kDNA metabolism pertaining to replication and transcription. Moreover, the peak expression of TcKAP7 after one hour of UV exposure suggests involvement in signaling or transcriptional control post DNA repair.

The swift cell death observed hints at the involvement of the DNA damage response pathway. Previous studies have suggested that RNA polymerase stalling at damaged sites may serve as a trigger for cell death [59,60]. TcKAP7's homology with TFAM, a protein implicated in mtDNA damage response [61], suggests its potential role in stimulating or regulating responses triggered by RNA polymerase stalling. The observation that TcKAP7 knockout can clear DNA damage from mitochondria, albeit with slightly different kinetics from WT cells (Figure 4), suggests a role beyond direct repair. Notably, TFAM knockout in tumor cells has been associated with decreased E2F1 protein levels, a factor connected with UV radiation response [61,62]. This suggests that TcKAP7 might respond to UV radiation in kDNA by modulating responses triggered by RNA polymerase stalling. The increase in TcKAP7 levels (Figure 4B) alongside repair kinetics indicates its indirect involvement in mitigating cisplatin and UV damage. It is noteworthy that the classical understanding that UV and cisplatin damage remain unrepaired in human cells [19,20,22] does not hold true for all eukaryotes, as evidenced

by our findings of decreased damage in *T. cruzi* (Figure 4A). Furthermore, several studies have demonstrated *T. cruzi*'s ability to address kDNA damage caused by various DNA-damaging agents, such as MMS [63], oxidative stress [31,32,64], and benzonidazole [65].

Variations in cell death pathways among mutants, particularly in TcKAP7 mutants, suggest distinct responses depending on the source of DNA damage. The data shows that Kap7 deficiency and treatment with mt-DOX lead to a kinase-dependent signaling cell death that is different from that signaled by lesions in the nuclear genome, as there is no exposure of phosphatidylserine on the membrane. It is interesting to note that the absence of DNA repair in the mitochondria is sufficient to alter the observed signaling cell death mechanism. Apoptosis in unicellular parasites like *T. cruzi* and *A. deanei* involves metacaspases rather than canonical caspases [67–70], highlighting the need for further investigation to verify whether death signaled by lesions in mitochondrial DNA also occurs through activation of metacaspases.

Transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER) is crucial for the UV and cisplatin response, with CSB being a key protein involved [41,71,72]. CSB facilitates recognition and removal of DNA lesions during transcriptional blockage, ensuring DNA integrity restoration. Severe damage triggers signaling pathways involving kinases such as ATM (ataxia telangiectasia mutated) and ATR (ATM- and Rad3-related), potentially leading to apoptosis or cellular senescence [75–78].

Cisplatin treatment revealed differential responses in TcCSB mutants, with TcCSB<sup>+</sup> cells demonstrating greater resistance than WT cells, while TcCSB<sup>+/-</sup> cells showed increased sensitivity. The slower repair kinetics observed in CSB knockout cells support the notion that TcCSB<sup>+/-</sup> cells are more susceptible due to inefficient lesion resolution. These findings parallel observations in human cells, where accelerated DNA repair confers resistance to cisplatin treatment [82].

Experiments with doxorubicin highlighted CSB's involvement in cellular responses, potentially impacting transcriptional restart post-treatment. Our findings suggest a role for CSB in kDNA damage response induced by mt-doxorubicin. For nuclear DNA, doxorubicin treatment is suggested to lead to the accumulation of R-loops [72]. Therefore, we speculate that the effects observed in CSB mutants and the rapid cell death may be caused by transcriptional impairment post-treatment, as evidenced by decreased transcript levels in CSB-deficient backgrounds after cisplatin treatment. The data show that Trypanosomatids have a DNA repair

pathway that is associated with transcription and that CSB is involved in this process. Further studies are needed to verify whether the canonical Tc-NER pathway is present in the mitochondria of these organisms, or whether an alternative process exists to allow the maintenance of the unique mitochondria of trypanosomatids. This study significantly advances our understanding of the unique mitochondrial responses in *T. cruzi*. Our findings underscore the distinct features and mechanisms of kDNA metabolism, challenging the notion that bulky lesions in mitochondrial DNA remain irreparable across most of eukaryotes. Collectively, these results suggest that kDNA metabolism may possess unique features and mechanisms as a consequence of its distinctive structure.

## FUNDING

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

## ACKNOWLEDGMENTS

Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) and Dr. Luciana de Oliveira Andrade for fluorescence microscopy support; Neuza Antunes Rodrigues and Lorraine Diniz de Carvalho Silva for technical support;

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Wesley Roger Rodrigues Ferreira:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Bruno Marçal Repolês:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Isabela Cecilia Mendes:** Formal analysis, Investigation, Data Curation, Visualization. **Antônio Vinícius de Assis:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Andrea Mara Macedo:** Formal analysis, Resources, Fundin acquisition. **Glória Regina Franco:** Formal analysis, Resources, Funding acquisition. **Stênio Perdigão Fragoso:** Methodology, Validation, Formal analysis, Resources, Writing - Review & Editing. **Camila Silva Gonçalves:** Formal analysis, Methodology, Validation, Investigation. **Carolina Moura Costa Catta-Preta:** Formal analysis, Methodology, Validation, Investigation. **Jeremy C. Mottram:** Formal analysis, Resources, Fundin acquisition. **Maria Cristina M. Motta:** Methodology, Validation, Formal analysis, Resources, Writing - Review & Editing. **Flávia Souza Morini:** Formal analysis, Methodology, Validation, Investigation. **Shana O. Kelley:** Resources. **Carlos Renato Machado:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## REFERENCES

- [1] R.E. Jensen, P.T. Englund, Network News: The Replication of Kinetoplast DNA, *Annu. Rev. Microbiol.* 66 (2012) 473–491. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150057>.
- [2] J. Lukes, D.L. Guilbride, J. Votýpka, A. Zíková, R. Benne, P.T. Englund, J. Voty, A. Zíkova, Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure, *Eukaryot. Cell.* 1 (2002) 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495>.
- [3] L. Simpson, A.M. Simpson, G. Kidane, L. Livingston, T.W. Spithill, The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (1980) 1053–1063. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.1053>.
- [4] R. Docampo, W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, S.N.J. Moreno, Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>.
- [5] T.A. Shapiro, Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993) 7809–7813. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7809>.
- [6] Y. Liu, P.T. Englund, The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication, *Mol. Microbiol.* 64 (2007) 676–690. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05686.x>.
- [7] G. Carvalho, B.M. Repolês, I. Mendes, P.H. Wanrooij, Mitochondrial DNA Instability in Mammalian Cells, *Antioxidants Redox Signal.* 36 (2022) 885–905. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0091>.
- [8] M. Alexeyev, I. Shokolenko, G. Wilson, S. LeDoux, The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012641>.
- [9] C.T. Anderson, E.C. Friedberg, The presence of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase in extracts of human KB cells, *Nucleic Acids Res.* (1980).
- [10] R. Chattopadhyay, L. Wiederhold, B. Szczesny, I. Boldogh, T.K. Hazra, T. Izumi, S. Mitra, Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 2067–2076. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl177>.
- [11] C.C. Pettepher, S.P. LeDoux, V.A. Bohr, G.L. Wilson, Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin, *J. Biol. Chem.* (1991).
- [12] K.G. Pinz, D.F. Bogenhagen, Efficient Repair of Abasic Sites in DNA by Mitochondrial Enzymes, *Mol. Cell. Biol.* 18 (2015) 1257–1265. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.3.1257>.
- [13] M. Manchekar, K. Scissum-Gunn, D. Song, F. Khazi, S.L. McLean, B.L. Nielsen, DNA recombination activity in soybean mitochondria, *J. Mol. Biol.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.070>.
- [14] F. Morel, M. Renoux, P. Lachaume, S. Alziari, Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of *Drosophila* cells are repaired, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.007>.
- [15] D. Mileshina, M. Koulintchenko, Y. Konstantinov, A. Dietrich, Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration, *Nucleic Acids Res.* (2011). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr517>.
- [16] L. Kazak, A. Reyes, I.J. Holt, Minimizing the damage: Repair pathways keep mitochondrial DNA intact, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm3439>.

- [17] N.C. de Souza-Pinto, P.A. Mason, K. Hashiguchi, L. Weissman, J. Tian, D. Guay, M. Lebel, T. V. Stevensner, L.J. Rasmussen, V.A. Bohr, Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria, *DNA Repair (Amst)*. 8 (2009) 704–719. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.021>.
- [18] P.A. Mason, E.C. Matheson, A.G. Hall, R.N. Lightowers, Mismatch repair activity in mammalian mitochondria, *Nucleic Acids Res.* (2003). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg167>.
- [19] D.A. Clayton, J.N. Doda, E.C. Friedberg, The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 (1974) 2777–2781. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.7.2777>.
- [20] B. Pascucci, A. Versteegh, A. Van Hoffen, A.A. Van Zeeland, L.H.F. Mullenders, E. Dogliotti, DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA, *J. Mol. Biol.* 273 (1997) 417–427. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1268>.
- [21] A. Yimit, O. Adebali, A. Sancar, Y. Jiang, Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08290-2>.
- [22] J.L. Podratz, A.M. Knight, L.E. Ta, N.P. Staff, J.M. Gass, K. Genelin, A. Schlattau, L. Lathroum, A.J. Windebank, Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons, *Neurobiol. Dis.* 41 (2011) 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.11.017>.
- [23] M. Scheibye-Knudsen, M. Ramamoorthy, P. Sykora, S. Maynard, P.C. Lin, R.K. Minor, D.M. Wilson, M. Cooper, R. Spencer, R. de Cabo, D.L. Croteau, V.A. Bohr, Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy, *J. Exp. Med.* (2012). <https://doi.org/10.1084/jem.20111721>.
- [24] M.P. Mori, R.A.P. Costa, D.T. Soltys, T. de S. Freire, F.A. Rossato, I. Amigo, A.J. Kowaltowski, A.E. Vercesi, N.C. De Souza-Pinto, Lack of XPC leads to a shift between respiratory complexes I and II but sensitizes cells to mitochondrial stress, *Sci. Rep.* 7 (2017) 155. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00130-x>.
- [25] I.J. Holt, Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap, *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009) 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.03.007>.
- [26] C.W. Xu, J.C. Hines, M.L. Engel, D.G. Russell, D.S. Ray, Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*., *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 564–576. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.2.564>.
- [27] N.K. Avliyakov, J. Lukeš, D.S. Ray, Mitochondrial histone-like DNA-binding proteins are essential for normal cell growth and mitochondrial function in *Crithidia fasciculata*, *Eukaryot. Cell.* (2004). <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.518-526.2004>.
- [28] J. Wang, V. Pappas-Brown, P.T. Englund, R.E. Jensen, TbKAP6, a mitochondrial HMG box-containing protein in *Trypanosoma brucei*, Is the first trypanosomatid kinetoplast-associated protein essential for kinetoplast DNA replication and maintenance, *Eukaryot. Cell.* 13 (2014) 919–932. <https://doi.org/10.1128/EC.00260-13>.
- [29] S.S.A. De Souza, C.M. Catta-Preta, J.M.P. Alves, D.P. Cavalcanti, M.M.G. Teixeira, E.P. Camargo, W. De Souza, R. Silva, M.C.M. Motta, Expanded repertoire of kinetoplast associated proteins and unique mitochondrial DNA arrangement of symbiont-bearing trypanosomatids, *PLoS One.* 12 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187516>.
- [30] M.C.M. Motta, A.C. de A. Martins, S.S.A. de Souza, C.M.C. Catta-Preta, R. Silva, C.C. Klein, L.G.P. de Almeida, O. de Lima Cunha, L.P. Ciapina, M. Brocchi, A.C. Colabardini, B. de Araujo Lima, C.R. Machado, C.M. de Almeida Soares, C.M. Probst, C.B.A. de Menezes, C.E. Thompson, D.C. Bartholomeu, D.F. Gradia, D.P. Pavoni, E.C. Grisard, F. Fantinatti-

- Garboggini, F.K. Marchini, G.F. Rodrigues-Luiz, G. Wagner, G.H. Goldman, J.L.R. Fietto, M.C. Elias, M.H.S. Goldman, M.F. Sagot, M. Pereira, P.H. Stoco, R.P. de Mendonça-Neto, S.M.R. Teixeira, T.E.F. Maciel, T.A. de Oliveira Mendes, T.P. Ürményi, W. de Souza, S. Schenkman, A.T.R. de Vasconcelos, Predicting the Proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and Their Respective Endosymbionts Reveals New Aspects of the Trypanosomatidae Family, *PLoS One*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060209>.
- [31] C. Furtado, M. Kunrath-Lima, M.A. Rajão, I.C. Mendes, M.B. de Moura, P.C. Campos, A.M. Macedo, G.R. Franco, S.D.J. Pena, S.M.R. Teixeira, B. van Houten, C.R. Machado, Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*, *PLoS One*. 7 (2012) e42484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042484>.
- [32] M. Kunrath-Lima, B.M. Repolês, C.L. Alves, C. Furtado, M.A. Rajão, A.M. Macedo, G.R. Franco, S.D.J. Pena, L. Valenzuela, S. Wisnovsky, S.O. Kelley, N. Galanti, G. Cabrera, C.R. Machado, Characterization of *Trypanosoma cruzi* MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response, *Infect. Genet. Evol.* 55 (2017) 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.030>.
- [33] M.A. Rajão, D.G. Passos-Silva, W.D. DaRocha, G.R. Franco, A.M. Macedo, S.D.J. Pena, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate, *Mol. Microbiol.* 71 (2009) 185–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06521.x>.
- [34] D. de O. Lopes, B.L.F. Schamber-Reis, C.G. Regis-da-Silva, M.A. Rajão, W.D. DaRocha, A.M. Macedo, G.R. Franco, S.C. Nardelli, S. Schenkman, J.S. Hoffmann, C. Cazaux, S.D.J. Pena, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, Biochemical studies with DNA polymerase  $\beta$  and DNA polymerase  $\beta$ -PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance, *DNA Repair (Amst)*. 7 (2008) 1882–1892. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.07.018>.
- [35] B.L.F. Schamber-Reis, S. Nardelli, C.G. Régis-Silva, P.C. Campos, P.G. Cerqueira, S.A. Lima, G.R. Franco, A.M. MacEdo, S.D.J. Pena, C. Cazaux, J.S. Hoffmann, M.C.M.H. Motta, S. Schenkman, S.M.R. Teixeira, C.R. MacHado, DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions, *Mol. Biochem. Parasitol.* 183 (2012) 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.02.007>.
- [36] D.P. Cavalcanti, M.K. Shimada, C.M.A. Probst, T.C.B.S. Souto-Padrn, W. De Souza, S. Goldenberg, S.P. Fragoso, M.C.M.H. Motta, Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*, *BMC Microbiol.* 9 (2009) 120. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-120>.
- [37] F.S.P. de Souza, R. de C.P. Rampazzo, L. Manhaes, M.J. Soares, D.P. Cavalcanti, M.A. Krieger, S. Goldenberg, S.P. Fragoso, Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: Effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation, *Mol. Biochem. Parasitol.* 172 (2010) 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.014>.
- [38] C.S. Gonçalves, C. Moura, C. Catta, B. Repolês, J.C. Mottram, W. De Souza, C.R. Machado, M.C.M. Motta, Importance of *Angomonas deanei* KAP4 for kDNA arrangement, cell division and maintenance of the host - bacterium relationship, *Sci. Rep.* (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88685-8>.
- [39] R. Benne, J. Van Den Burg, J.P.J. Brakenhoff, P. Sloof, J.H. Van Boom, M.C. Tromp, Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA, *Cell*. 46 (1986) 819–826. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90063-2).
- [40] J. Telleria, D.G. Biron, J. Brizard, E. Demettré, M. Séveno, C. Barnabé, Phylogenetic character

- mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*, (2010) 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015496107>.
- [41] M. D’Errico, B. Pascucci, E. Iorio, B. Van Houten, E. Dogliotti, The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response, *Mech. Ageing Dev.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.03.006>.
- [42] J.L.O. Pohjoismäki, T. Boettger, Z. Liu, S. Goffart, M. Szibor, T. Braun, Oxidative stress during mitochondrial biogenesis compromises mtDNA integrity in growing hearts and induces a global DNA repair response, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 6595–6607. <https://doi.org/10.1093/nar/gks301>.
- [43] J.C. Hines, D.S. Ray, Tandem arrangement of two genes encoding kinetoplast-associated H1 histone-like proteins, *Mol. Biochem. Parasitol.* 89 (1997) 41–49. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00099-6).
- [44] M.P. Stokes, J. Rush, J. MacNeill, M.R. Jian, K. Sprott, J. Nardone, V. Yang, S.A. Beausoleil, S.P. Gygi, M. Livingstone, H. Zhang, R.D. Polakiewicz, M.J. Comb, Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0707579104>.
- [45] D. Cortez, Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 37139–37145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307088200>.
- [46] I. Hickson, Y. Zhao, C.J. Richardson, S.J. Green, N.M.B. Martin, A.I. Orr, P.M. Reaper, S.P. Jackson, N.J. Curtin, G.C.M. Smith, Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM, *Cancer Res.* 64 (2004) 9152–9159. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2727>.
- [47] J.D. Charrier, S.J. Durrant, J.M.C. Golec, D.P. Kay, R.M.A. Knegt, S. MacCormick, M. Mortimore, M.E. O’Donnell, J.L. Pinder, P.M. Reaper, A.P. Rutherford, P.S.H. Wang, S.C. Young, J.R. Pollard, Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Protein Kinase as Potential Anticancer Agents, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 2320–2330. <https://doi.org/10.1021/jm101488z>.
- [48] G.R. Chamberlain, D. V. Tulumello, S.O. Kelley, Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 1389–1395. <https://doi.org/10.1021/cb400095v>.
- [49] H. Taymaz-Nikerel, M.E. Karabekmez, S. Eraslan, B. Kırdar, Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31939-9>.
- [50] M.E. Geijer, J.A. Marteijn, What happens at the lesion does not stay at the lesion: Transcription-coupled nucleotide excision repair and the effects of DNA damage on transcription in cis and trans, *DNA Repair (Amst)*. 71 (2018) 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.007>.
- [51] J.A. Marteijn, H. Lans, W. Vermeulen, J.H.J.J. Hoeijmakers, Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>.
- [52] R.P. Rastogi, Richa, A. Kumar, M.B. Tyagi, R.P. Sinha, Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair, *J. Nucleic Acids.* 2010 (2010) 1–32. <https://doi.org/10.4061/2010/592980>.
- [53] J.L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 63 (2001) 88–102. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00206-8).

- [54] J. Lukeš, J.C. Hines, C.J. Evans, N.K. Avliyakov, V.P. Prabhu, J. Chen, D.S. Ray, Disruption of the *Crithidia fasciculata* KAP1 gene results in structural rearrangement of the kinetoplast disc, *Mol. Biochem. Parasitol.* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00348-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00348-6).
- [55] A.A. Zuma, D.P. Cavalcanti, M.C.P. Maia, W. De Souza, M.C.M. Motta, Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 37 (2011) 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.031>.
- [56] A.A. Zuma, D.P. Cavalcanti, M. Zogovich, A.C.L. Machado, I.C. Mendes, M. Thiry, A. Galina, W. de Souza, C.R. Machado, M.C.M. Motta, Unveiling the effects of berenil, a DNA-binding drug, on *Trypanosoma cruzi*: implications for kDNA ultrastructure and replication, *Parasitol. Res.* 114 (2014) 419–430. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4199-8>.
- [57] J.M. Malinge, M.J. Giraud-Panis, M. Leng, Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA, *J. Inorg. Biochem.* 77 (1999) 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00148-8).
- [58] A. Basu, S. Krishnamurthy, Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage, *J. Nucleic Acids.* 2010 (2010) 1–16. <https://doi.org/10.4061/2010/201367>.
- [59] A. Gyenis, J. Chang, J.J.P.G. Demmers, S.T. Bruens, S. Barnhoorn, R.M.C. Brandt, M.P. Baar, M. Raseta, K.W.J. Derks, J.H.J. Hoeijmakers, J. Pothof, Genome-wide RNA polymerase stalling shapes the transcriptome during aging, *Nat. Genet.* 55 (2023) 268–279. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01279-6>.
- [60] P.C. Hanawalt, G. Spivak, Transcription-coupled DNA repair: Two decades of progress and surprises, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 958–970. <https://doi.org/10.1038/nrm2549>.
- [61] R. Zhang, J. Wang, HuR stabilizes TFAM mRNA in an ATM/p38-dependent manner in ionizing irradiated cancer cells, *Cancer Sci.* (2018). <https://doi.org/10.1111/cas.13657>.
- [62] X. Jiang, J. Wang, Down-regulation of TFAM increases the sensitivity of tumour cells to radiation via p53/TIGAR signalling pathway, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (2019) 4545–4558. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14350>.
- [63] T. Marco Antônio Salgado Martins, E. de Figueiredo Peloso, H.M. Costa-Silva, M.A. Rajão, B. Van Houten, C.R. Machado, F. Ramos Gadelha, Mitochondrial behavior during nuclear and mitochondrial DNA repair in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Exp. Parasitol.* 219 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108016>.
- [64] P.H.N. Aguiar, C. Furtado, B.M. Repolês, G.A. Ribeiro, I.C. Mendes, E.F. Peloso, F.R. Gadelha, A.M. Macedo, G.R. Franco, S.D.J. Pena, S.M.R. Teixeira, L.Q. Vieira, A.A. Guarneri, L.O. Andrade, C.R. Machado, Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002279>.
- [65] M.A. Rajão, C. Furtado, C.L. Alves, D.G. Passos-Silva, M.B. De Moura, B.L. Schamber-Reis, M. Kunrath-Lima, A.A. Zuma, J.P. Vieira-da-Rocha, J.B.F. Garcia, I.C. Mendes, S.D.J. Pena, A.M. Macedo, G.R. Franco, N.C. De Souza-Pinto, M.H.G. De Medeiros, A.K. Cruz, M.C.M. Motta, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*, *Environ. Mol. Mutagen.* 55 (2014) 309–321. <https://doi.org/10.1002/em.21839>.
- [66] B.A. Hilton, Z. Li, P.R. Musich, H. Wang, B.M. Cartwright, M. Serrano, X.Z. Zhou, K.P. Lu, Y. Zou, ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1, *Mol. Cell.* 60 (2015) 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.008>.
- [67] A.G. Uren, K. O'Rourke, L. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin, V.M. Dixit, Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins,

- one of which plays a key role in MALT lymphoma, *Mol. Cell.* (2000).  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00094-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00094-0).
- [68] C.G. Freire-De-Lima, D.O. Nascimento, M.B.P. Soares, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, F.G. De Mello, G.A. DosReis, M.F. Lopes, Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages, *Nature.* 403 (2000) 199–203.  
<https://doi.org/10.1038/35003208>.
- [69] G. Kosec, V.E. Alvarez, F. Agüero, D. Sánchez, M. Dolinar, B. Turk, V. Turk, J.J. Cazzulo, Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators, *Mol. Biochem. Parasitol.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.001>.
- [70] E. de Castro, T.L. Reus, A.M. de Aguiar, A.R. Ávila, T. de Arruda Campos Brasil de Souza, Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*, *Apoptosis.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1428-5>.
- [71] A.J. Van Gool, E. Citterio, S. Rademakers, R. Van Os, W. Vermeulen, A. Constantinou, J.M. Egly, D. Bootsma, J.H.J. Hoeijmakers, The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex, *EMBO J.* (1997). <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5955>.
- [72] F.F. Busatto, S.Y. Mersaoui, Y. Sun, Y. Pommier, J.Y. Masson, J. Saffi, Functions of the CSB Protein at Topoisomerase 2 Inhibitors-Induced DNA Lesions, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.727836>.
- [73] J. -K Kim, D. Patel, B. -S Choi, CONTRASTING STRUCTURAL IMPACTS INDUCED BY cis-syn CYCLOBUTANE DIMER AND (6–4) ADDUCT IN DNA DUPLEX DECAMERS: IMPLICATION IN MUTAGENESIS AND REPAIR ACTIVITY, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995) 44–50. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb05236.x>.
- [74] C.P. Selby, A. Sancar, Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 11205–11209.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11205>.
- [75] J. Smith, L. Mun Tho, N. Xu, D. A. Gillespie, The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer, *Adv. Cancer Res.* 108 (2010) 73–112.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>.
- [76] M. Caputo, A. Balzerano, I. Arisi, M. D’Onofrio, R. Brandi, S. Bongiorno, S. Brancorsini, M. Frontini, L. Proietti-De-Santis, CSB ablation induced apoptosis is mediated by increased endoplasmic reticulum stress response, *PLoS One.* 12 (2017).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172399>.
- [77] D.S.F. Biard, Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3535–3550.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm195>.
- [78] N.L. Batenburg, J.R. Walker, S.M. Noordermeer, N. Moatti, D. Durocher, X.D. Zhu, ATM and CDK2 control chromatin remodeler CSB to inhibit RIF1 in DSB repair pathway choice, *Nat. Commun.* 8 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02114-x>.
- [79] Z.H. Siddik, Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene.* 22 (2003) 7265–7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
- [80] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>.
- [81] G.E. Damsma, A. Alt, F. Brueckner, T. Carell, P. Cramer, Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2007).  
<https://doi.org/10.1038/nsmb1314>.

- [82] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mechanisms of resistance to cisplatin, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 478 (2001) 23–43. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00141-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00141-5).
- [83] A.B. Hall, D. Newsome, Y. Wang, D.M. Boucher, B. Eustace, Y. Gu, B. Hare, M.A. Johnson, S. Milton, C.E. Murphy, D. Takemoto, C. Tolman, M. Wood, P. Charlton, J.D. Charrier, B. Furey, J. Golec, P.M. Reaper, J.R. Pollard, Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970, *Oncotarget.* 5 (2014) 5674–5685. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2158>.
- [84] F.P. Vendetti, A. Lau, S. Schamus, T.P. Conrads, M.J. O'Connor, C.J. Bakkenist, The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo, *Oncotarget.* 6 (2015) 44289–44305. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6247>.
- [85] Batista, M., Marchini, F. K., Celedon, P. A., Fragoso, S. P., Probst, C. M., Preti, H., ... & Krieger, M. A. (2010). A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC microbiology*, 10, 1-12.

## SUPPLEMENTARY TABLES

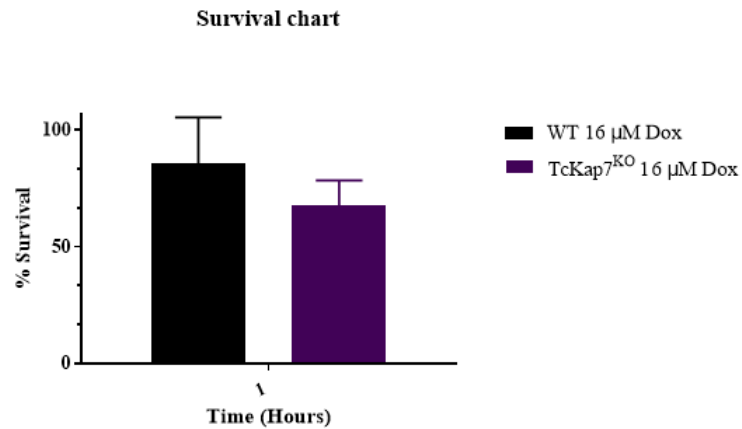
**Table 1** – Primers sequences used in this work

Name	Primer sequence
KAP7FLAGFw	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCCGCAAGTATTCAGCAGCCC
KAP7FLAGRv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGTACATGGCGTACGGGTTG
RecKAP7F	AAAGGATCCATGCTAAGAAGTGTCTGCCACTG
RecKAP7R	TCAGCGTCGACTTATGACGGTGGTGCAGGATCAGCAGCTGCAGTATTTT
5UpsKAP71Fw	GGGGTCGACCGTTGCTGGTTTTTCTTTTGGTGT
5UpsKAP71Rv	GGGAAGCTTGCTTCAAACGTCTATGCGGGC
3DowKAP71Fw	GGGGAATTCGCCTCATATGACGCATCTCCCA
3DowKAP71rv	GGGGGATCCTGTTGGCGCTGTCAAGGAAGTAAG
KAP7HigroFw	GGGGGAAGCTTATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC
KAP7HigroRv	GGGAAGCTTCTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG
qPCRMitF	TTTTATTTGGGGGAGAACGGAGCG
qPCRMitR	TTGAAA CTGCTTTCCCAAACGCC
qPCRMitSmF	CGCTCTGCCCCC ATAAAAAACCTT
RPL9F	ACCGTTGTGAAGGACGAACT
RPL9R	TTCACCAGGCAGAGCTGATG
GAPDHF	CGGTGGACGGTGTGTCCGGTG
GAPDHR	CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG
COIF	GGTGGGTGATATGCGTCTATTGCAG
COIR	CAC CTA CCC GGT TCT CTA CCT TTA TAC CTA
ATP6eF	GAATTTTTAGCAAAGGGGAAAA
ATP6eR	AAAATGGGAAAATGCTTTCAA
ATP6mF	GCGGGCAACAACGGTTTTGAAA
ATP6mR	TAAGCTTGCCAAAAACGCCTCCT
ND7F	ATG GGA GCG GAT TTT CGA ACG AG
ND7R	CAA GCT AGA TTC CGG GTC CCT

**Table 2** – Survival values of cells pre-treated with ATM inhibitor, ATR inhibitor and caffeine after UV exposure

	1500J/m2	1500J/m2+iATM	1500J/m2+iATR	1500J/m2+Caffeine
Dm28c	57,53 ± 4,33	56,06 ± 6,94	85,64 ± 7,55	96,97 ± 5,25
TcKAP7KO	37,12 ± 4,21	51,21 ± 11,86	78,55 ± 2,82	97,22 ± 4,81
p-value	*	ns	ns	ns

## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Supplementary figure 1 - TcKap7 and Cl Brener WT cells response to DOX.** Survival graph after exposure to 16μM DOX in WT and TcKAP7KO cells 1h after treatment (\*P<0.05, student t test).