

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Me. Willian dos Reis Bertoldo

Estudo dos mecanismos moleculares da via de sinalização à resposta a danos ao DNA relacionada com o reparo acoplado à transcrição em *Trypanosoma cruzi*.

Belo Horizonte

2021

Me. Willian dos Reis Bertoldo

Estudo dos mecanismos moleculares da via de sinalização à resposta a danos ao DNA relacionada com o reparo acoplado à transcrição em *Trypanosoma cruzi*.

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

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado.

Belo Horizonte

2021

043 Bertoldo, Willian dos Reis.
Estudo dos mecanismos moleculares da via de sinalização à resposta a danos ao DNA relacionada com o reparo acoplado à transcrição em *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Willian dos Reis Bertoldo. – 2021.
241 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Dano ao DNA. 4. Reparo do DNA. 5. Transcrição Genética. 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 (CB/UFG)
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-bio@cb.ufmg.br (31)3409-2016



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE WILLIAN DOS REIS BERTOLDO.
 Aos três dias do mês de novembro de 2021 às 13:00 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 “Estudo dos mecanismos moleculares da via de sinalização à resposta a danos ao DNA relacionadas com o reparo acoplado à transcrição em *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. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Lucymara Fassarella Agnez (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), aprovado; Dra. Andrea Rodrigues Avila (Fiocruz- PR), aprovado; Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Universidade de São Paulo), 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, 03 de novembro de 2021.


 Dra. Marianna Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)


 Dra. Lucymara Fassarella Agnez Lima (Universidade Federal do Rio Grande do Norte)


 Dra. Andrea Rodrigues Avila (Fiocruz- PR)


 Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Universidade de São Paulo)


 Dr. Carlos Renato Machado - Orientador (UFMG)

Dedico essa tese a todos que me apoiaram e incentivaram ao longo desta jornada e também aos Cientistas do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Carlos Renato Machado por ser um entusiasta dos estudos de Reparo de DNA. Desse modo, a sua dedicação na orientação do meu trabalho junto ao seu companheirismo me permitiu evoluir no âmbito técnico-científico, assim, somando ao amadurecimento do meu senso crítico em relação à Ciência e o despertar de novos questionamentos como Biologista Molecular.

Aos membros do Laboratório de Genética Bioquímica – ICB – UFMG, aos professores Dr. Sergio Danilo Pena, Dra. Andréa Mara Macedo, Dra. Glória Regina Franco e Dr. Erich Birelli Tahara agradeço pelas ricas discussões durante nossas reuniões semanais e seminários assim como as sugestões apresentadas ao projeto. A todos os amigos (as) alunos (as) do LGB os quais compartilhamos muitos bons momentos. Também agradeço às técnicas do laboratório, Sra. Neuza Antunes e Sra. Lorrane Diniz de Carvalho Silva, por coordenarem as atividades de manutenção do LGB e por sempre ajudar.

Aos amigos do meu grupo de pesquisa, Dra. Isabela Cecília Mendes, Dr. Bruno Marcal Repolês, Dra. Hellida Marina Costa e Silva, Dr. Bruno Carvalho Resende, Ms. Verônica Santana da Silva, Ms. Wesley Roger Rodrigues Ferreira, Sr. Adalberto Sales Miranda Junior e a todos do grupo do Nem eu agradeço pelo companheirismo, amizade e ajuda durante a minha jornada com vocês e pelas ideias e sugestões ao projeto e bons momentos de descontração.

A todos os colaboradores que somam a esse trabalho e fazem dessa aliança à concretização de que foi possível juntos. Assim, agradeço o Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem, Ms. Karim de Sousa Marins, Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui, Dr. Denis Alexis Molina, Dra. Luciana Andrade de Oliveira, Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, Dra. Viviane Grazielle da Silva, Dr. Daniela Ferreira Chame, Ms. Daniela de Laet Souza e aos demais colaboradores.

À Universidade Federal de Minas Gerais minha *alma mater* a qual tenho grande orgulho de ser membro. Eu agradeço ao acesso a infraestrutura e recursos tecnológicos e

em especial ao Centro de Microscopia da UFMG ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagem - CAPI e ao Laboratório de Proteômica do Instituto de Ciências Biológicas e também aos demais serviços prestados.

À Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a qual eu tive a honra de comemorar os seus 50 anos sendo um dos seus alunos de doutorado. Aos professores da PG-BIQ por todo conhecimento fornecido durante as disciplinas ministradas. Agradeço à Dra. Leda Quercia Vieira coordenadora do curso e a todos os funcionários da PG-BIQ e em especial o Sr. Orlando Rocha de Matos - *In memoriam* e ao Sr. Alexandre Estevan dos Santos.

Às agências de fomento, CNPq, Capes e FAPEMIG, pelo financiamento que tornou possível a execução deste trabalho. Agradeço o acesso às bolsas de estudos durante toda a minha jornada acadêmica. Assim, agradeço a Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia (PGMTI) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e em especial ao UNIARAXÁ onde vivi a minha primeira experiência na iniciação científica o que me incentivou a seguir a carreira acadêmica, desse modo, cumprimento meus ex-orientadores, Dr. André Luiz Pedrosa, Dr. Carlos Henrique de Freitas, Dra. Laura Teodoro de Oliveira, Dra. Aline do Carmo França Botelho, Dra. Danielle Rodrigues dos Santos, Dra. Juliana Luzia Franca e a todos os meus ex-professores.

À minha família, que sempre torceu para eu alcançar meus objetivos. Aos meus pais, Sr. Linomar dos Reis Bertoldo e Sra. Rosangela de Fátima Bertoldo o meu muito obrigado por tudo e sempre, a vocês eu serei eternamente grato. Ao meu irmão Linomar dos Reis Bertoldo Filho e sua Família pelo apoio, amor e companheirismo. Aos meus amigos, que de longe ou perto compartilhamos as nossas alegrias e conquistas e tornam minha vida mais feliz.

Ao Deus, à Fé, à Ciência.

Muito obrigado a todos!

“A vida não tomou conta do planeta competindo, mas formando alianças”.

Lynn Margulis

RESUMO

O estresse transcricional que leva à parada da RNA polimerase pode ser causado por danos ao DNA. A RNA polimerase paralisada é um importante sinal para iniciar o reparo acoplado à transcrição (TC-NER). Previamente demonstramos que altas doses de UV matam o *Trypanosoma cruzi* rapidamente, as lesões de DNA geradas no genoma nuclear do parasito podem ser persistentes. Além disso, os estudos de TcCSB, a proteína chave no reconhecimento da RNA polimerase paralisada, indicaram que essa proteína é importante para o parasito lidar com os danos ao DNA. A superexpressão de TcCSB aumentou a sensibilidade das células à luz UV de modo dependente das cinases ATM/ATR. Por outro lado, as células heminocautas de TcCSB mostraram ser resistentes à UV. Esses resultados sugerem que o bloqueio da transcrição é um estímulo para desencadear um mecanismo de morte sinalizada em *T. cruzi*. Logo, um dos objetivos deste trabalho em *T. cruzi* foi verificar se o bloqueio da transcrição após danos por UV é a principal causa da morte, para isso, as células foram pré-tratadas com α -amanitina e desafiadas com UV (1.500 J/m²). Ademais, para investigar se a sensibilidade a UV é dependente da fase do ciclo celular, as células foram sincronizadas com hidroxiuréia (20 mM) e o ciclo celular determinado por FACS, em seguida as células foram desafiadas com UV (1.500 J/m²). Visto que, a via de resposta a danos ao DNA (DDR) durante a transcrição resulta da interação com outras proteínas que são mediadoras. Resolvemos investigar o papel das mediadoras TcRPA, TcRNaseH1, TcRNaseH2A, através da superexpressão desses genes e descrevemos o fenótipo dessas linhagens após UV (1.500 J/m²). Por fim, após a obtenção do anticorpo anti-TcCSB, realizamos a imunolocalização da proteína TcCSB após irradiação com a luz UV (500 J/m²). Em nossos resultados observamos que, as células pré-tratadas com um inibidor seletivo da RNA polimerase II, se tornam resistentes à UV, porém, quando esse composto é removido e o processo de transcrição reiniciado, as células tornam-se sensíveis à UV novamente. Ademais, a sobrevivência das células em fases G1 e G2 é afetada após a exposição à luz UV, uma vez que na fase G1 ocorre um aumento da taxa de morte e a fase G2 leva a uma maior sobrevivência do parasito. E demonstramos que, a superexpressão dos genes RPA, RNaseH1 e RNaseH2A está relacionada ao fenótipo de resistência celular após UV. Após a irradiação UV, a proteína TcCSB, até duas horas, foi encontrada concentrada núcleo e no kDNA e em pequenos *foci* perinucleares. Após quatro horas, TcCSB apresenta uma distribuição granular no citoplasmática, não sendo observada após 24 horas. Esses dados sugerem que a morte observada após a exposição à UV é dependente da paralisação da RNA polimerase em etapa inicial de síntese de mRNA. E que possivelmente a DDR durante a transcrição requer a participação de TcRNAPIII, TcCSB e quinases TcATM e TcATR de acordo com as fases do ciclo celular. Como também que, a interação RPA-RNaseH1 e RPA-RNaseH2A seja necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados com a formação de *R-loop*. Tomado em conjunto, esses dados sugerem que a via TC-NER é importante para a sobrevivência do parasito após UV, de modo a assegurar a manutenção da integridade da transcrição multigênica.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Proteína CSB (*cockayne syndrome type B*). Reparo por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição. Sinalização de resposta a danos ao DNA.

ABSTRACT

Transcriptional stress which leads to RNA polymerase arrest can be caused by damage to the DNA. The stalled RNA polymerase is a significant signal to begin the transcription-coupled repair (TC-NER). Our previous results showed that high doses of UV kill the *Trypanosoma cruzi* rapidly and demonstrate that DNA lesions caused in the nuclear genome of the parasite can be persistent. In addition, studies of TcCSB, key protein in recognizing the stalled RNA polymerase, show that this protein is important for the parasite to deal with the DNA damage caused by genotoxic agents. Overexpression of TcCSB increased cell sensitivity to UV light in ATM/ATR kinase-dependent manner. On the other hand, TcCSB single-knockout cells showed resistance to UV light. These results suggest that the blockage of transcription is a stimulus to trigger a signaled death mechanism in *T. cruzi*. One of the objectives of this work was to verify if transcription blockage after UV damage is the principal cause of death, for this, the cells were pre-treated with α -amanitin and challenged with UV (1.500 J/m²). In addition, to investigate whether the sensitivity of *T. cruzi* to UV light is dependent on the cell cycle phase, the cells were synchronized with hydroxyurea (20mM) and the cell cycle determined by FACS, then, the cells were treated with UV (1.500 J/m²). Since, the DNA damage response pathway (DDR) during transcription results from the interaction with other proteins which are mediators. In this work, we investigated the role of TcRPA, TcRNAseH1, TcRNAseH2A mediators through the overexpression of these genes and we describe the phenotype of these strains after UV (1,500 J/m²). Finally, in this work, after obtaining the anti-TcCSB antibody, we performed the immunolocalization of the protein after irradiation with UV light (500 J/m²). In our results, we observe that cells pre-treated with a selective inhibitor of RNA polymerase II, which showed that these cells become resistant to UV light. However, when this compound was removed and the transcription process re-initiated, the cells went back to being sensitive to UV. Furthermore, our results allow us to conclude that G1 and G2 phases of the cell cycle affect the survival after exposure to UV light since in G1 phase an increase in death level occurs and phase G2 leads to a greater survival of the parasite. After UV irradiation, CSB protein was found concentrated in little *foci* located around the nucleus and in the kDNA for up to two hours. Differently, four hours after UV irradiation, the CSB protein presents a granular cytoplasmic distribution. Nevertheless, 24 hours after the irradiation, we did not observe any CSB labeling. Taken together, these data suggest that the death observed after exposure UV is dependent on RNA polymerase stalled in the initial phase of synthesis with the participation of TcRNAPolIII, TcCSB and TcATM and TcATR kinases according to the phase of the cell cycle. As well, it is proposed that the interaction of RPA-RNaseH1 and RPA-RNaseH2A is necessary to prevent causing DNA damage associated to R-loop and cell death. In conclusion, taken together, these data suggest that the TC-NER pathway is important for the parasite survival after UV in a way to ensure the maintenance of multigene transcription integrity.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. CSB protein (cockayne syndrome type B). Transcription-coupled nucleotide excision repair. DNA damage response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 2: Representação esquemática de tripanossomatídeos	29
Figura 3: Reparo por Excisão de Nucleotídeos	41
Figura 4: Convergência das etapas finais das subvias GG-NER e TC-NER	43
Figura 5: Análise do fenótipo das linhagens celulares de <i>T. cruzi</i> após radiação UV	46
Figura 6: Os processos reguladores mediados por ciclina dependente de quinase e o <i>checkpoint</i> influenciam as vias de reparo do DNA	49
Figura 7: Análise do fenótipo das linhagens celulares de <i>T. cruzi</i> após radiação UV sob efeito da inibição de cinases	51
Figura 8: Eventos de ubiquitinação durante TC-NER	57
Figura 9: Sobrevivência celular em células selvagem pré-tratadas com α -amanitina e expostas à UV	80
Figura 10: Crescimento celular em células selvagem pré-tratadas com α -amanitina e expostas à UV	81
Figura 11: Sobrevivência celular em células heminocaute de TcCSB pré-tratadas com α -amanitina e expostas à UV e crescimento celular	82
Figura 12: Sobrevivência celular em células superexpressora de TcCSB tratadas com α -amanitina e expostas à UVC e crescimento celular	83
Figura 13: Imunofluorescência para RNAs recém-sintetizados de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após exposição à radiação gama	85
Figura 14: Curva de crescimento celular em células selvagem controle e tratadas com 500Gy e sobrevivência celular de células selvagem controle e pré-tratadas com irradiação ionizante desafiadas com irradiação UV.	86
Figura 15: Análise de sobrevivência celular à UVC ciclo celular fase-dependente.	89
Figura 16: Sobrevivência de células selvagem e linhagens superexpressora e heminocaute de TcRPA de <i>T. cruzi</i> expostas à UVC	92
Figura 17: Crescimento celular de células selvagem e linhagens superexpressora e heminocaute de TcRPA de <i>T. cruzi</i> expostas à UVC	93
Figura 18: Amplificação do gene TcRNAseH1 e TcRNAseH2A por PCR	98
Figura 19: Reação de PCR de colônias para amplificação dos genes em estudo TcNAseH1 e TcRNAseH2A, respectivamente	99

Figura 20: Digestão enzimática dos plasmídeos pGEM-T-Easy+TcRNaseH1 e pGEM-T-Easy+TcRNaseH2A, respectivamente.	100
Figura 21: Digestão enzimática dos plasmídeos pROCK-NEO+TcRNaseH1 e pROCK-NEO+TcRNaseH2A, respectivamente.	101
Figura 22: Sobrevivência de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNaseH1 de <i>T. cruzi</i> expostas à UVC	103
Figura 23: Crescimento celular de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNaseH1 de <i>T. cruzi</i> expostas à UVC	103
Figura 24: Sobrevivência de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNaseH2A de <i>T. cruzi</i> expostas à UVC	104
Figura 25: Crescimento celular de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNaseH2A de <i>T. cruzi</i> expostas à UVC	104
Figura 26: Curva dose-resposta do crescimento celular das células tratadas com PR619	108
Figura 27: Sobrevivência celular em células selvagem e heminocaute de CSB pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV	109
Figura 28: Crescimento celular em células selvagem e heminocaute de CSB pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV	110
Figura 29: Sobrevivência celular em células selvagem pré-tratadas com MG-132 e expostas à UV e crescimento celular	111
Figura 30: Representação gráfica da sequência de aminoácidos constituinte da porção expressa de TcCSB	113
Figura 31: Expressão heteróloga de parte da proteína TcCSB visualizada em gel SDS-PAGE	114
Figura 32: SDS-PAGE para separação e visualização das bandas das proteínas BSA e TcCSB utilizadas para análise por espectrometria de massa	115
Figura 33: Espectro de massa da amostra controle positivo BSA por MS/MS	116
Figura 34: Espectro de massa da amostra teste para TcCSB por MS/MS	117
Figura 35: Resultado da análise de identificação de proteínas no banco de dados MASCOT	118
Figura 36: Resultado da análise de identificação de proteína no banco de dados MASCOT	119
Figura 37: <i>Western Blot</i> anti-TcCSB em extrato total das linhagens selvagem e	120

superexpressora e quantificação dos níveis de TcCSB

Figura 38: Imunolocalização de CSB após irradiação UV-C na linhagem selvagem de *T. cruzi* 122

Figura 39: Imunolocalização de CSB trinta minutos após irradiação UV-C em linhagens de *T. cruzi* 123

Figura 40: Imunolocalização de CSB após irradiação UV nos tempos de duas e quatro horas em linhagens de *T. cruzi* 124

Figura 41: Imunolocalização de CSB após irradiação UV nos tempos de duas e quatro horas em linhagens de *T. cruzi* 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> e suas sequências correspondentes para amplificação dos genes TcRNAseH1 e TcRNAseH2A.	66
Tabela 2: Programa de termociclagem para a amplificação dos genes TcRNAseH1 e TcRNAseH2A por PCR.	67
Tabela 3: Supostos homólogos dos genes que codificam para as proteínas RNAseH1 e RNAseH2A em <i>T. cruzi</i> .	94
Tabela 4: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNAseH1 de <i>T. cruzi</i> (cepa CL Brener – alelo <i>Esmeraldo-Like</i>), TcCLB.506351.40.	95
Tabela 5: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNAseH1 de <i>T. cruzi</i> (cepa CL Brener- alelo <i>Non-Esmeraldo-Like</i>), TcCLB.505939.60.	95
Tabela 6: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNAseH2A de <i>T. cruzi</i> (cepa CL Brener - alelo <i>Esmeraldo-Like</i>), TcCLB.510293.70.	96
Tabela 7: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNAseH2A de <i>T. cruzi</i> (cepa CL Brener - alelo <i>Esmeraldo-Like</i>), TcCLB.508661.50.	96
Tabela 8: Supostos homólogos dos genes que codificam para a proteína USP7 (<i>Ubiquitin-Specific Peptidase 7</i>) em <i>T. cruzi</i> .	106
Tabela 9: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da suposta USP7 de <i>T. cruzi</i> (cepa CL Brener - alelo <i>Esmeraldo-Like</i>), Tc.CLB.510761.70.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4PPs: (6-4 *photoproducts*) fotoprodutos 6-4

ACN: Acetonitrila

ADP: Adenosine difosfato

AP: Apurínico/Apirimidínico

ATM: (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) Ataxia Telangiectasia mutado

ATP: Adenosina trifosfato

ATR: (*Ataxia Telangiectasia Rad3 Related*) Ataxia Telangiectasia relacionado a Rad3

ATRIP: Proteína de Interação com ATR

BER: Reparo por Excisão de Bases

BIR: Replicação Induzida por Quebra (*Break-Induced Replication*)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BRCA1: *Breast Cancer 1*

BRCA2: *Breast Cancer 2*

BrDU: 5-bromo-2-deoxyuridine

BSA: (*Bovine serum albumine*) Albumina do soro bovino

BZ: Benzonidazol

CAF1: *Chromatin assembly factor-1*

Caprin1: Proteína 1 associada ao ciclo celular

CDC: Proteína de controle da divisão celular

CHK1: (*Checkpoint kinase-1*) Proteína cinase do *checkpoint 1*

CHK2: (*Checkpoint kinase-2*) Proteína cinase do *checkpoint 2*

Complexo 9-1-1: Complexo de proteínas formado por Rad9, Rad1 e Hus1

Complexo CAK: Complexo ativador de quinases.

Complexo MRN: Complexo de proteínas constituído por Mre11, Rad50 e Nbs1

Complexo Rad17-RFC: Complexo formado pelas proteínas Rad17 e RFC (*Replication Factor C* – fator de replicação C)

CPD: (*Cyclobutane Pyrimidine Dimer*) Dímero de pirimidina ciclobutano

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CRK9: *Cyclin-Dependent Kinase - 9*

CRL4: Culina-4A do complexo 3 da ligase de ubiquitina

CSA: Síndrome de Cockaine A

CSB: Síndrome de Cockaine B

CSTF: Fator de estimulação de clivagem do pré-mRNA

CTD: Domínio C-terminal de RNA Pol II

DAPI: 4-6-diamino-2-fenilindol

DC: Doença de Chagas

DDB: Proteína 2 de ligação a danos de DNA

DDR: (*DNA Damage Response*) resposta a danos no DNA

DHH1: ATP-dependente RNA helicase

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos

DSB: (*Double Strand Breaks*) Quebras de fita dupla

DTT: - Ditioneitol ($C_4H_{10}O_2S_2$)

DTU: Unidade discreta de tipagem

DUBs: Deubiquitinasas

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

ELISA: Ensaio Imunoabsorvente Enzimático

ERCC1: *Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit*

ERCC6: *Excision Repair 6, Chromatin Remodeling Factor*

FMRP: *Fragile X mental retardation 1 gene*

G3BP1: *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*

G418: Gentamicina - análogo do sulfato de neomicina

GATAD2A: *GATA Zinc Finger Domain Containing 2 repressor*

GG-NER: Sub-via do NER: (*Global Genome Repair*) Reparo global do genoma

Gy: *Gray* - unidade de dose de radiação

H2AX: variante da proteína histona da família H2A

HR: (*Homologous Recombination*) Recombinação homóloga

IAA: iodoacetamida

ICLs: *DNA interstrand cross-links*

IDR: *Intrinsically disordered proteins*

IPTG: isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo

IR: (*Ionizing radiation*) - Radiação ionizante

J/cm²: Joule por centímetro quadrado

Kb: kilobase

kDNA: (*kinetoplast DNA*) DNA do cinetoplasto

LIG1: DNA ligase 1

LIG3: DNA ligase 3

LIT: *Liver infusion-tryptose*

MADI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*

Mb: Megabase

MEC1: *Serine/threonine-protein kinase 1*

MFD: *Mutation Frequency Decline Gene*

MG-132: (C₂₆H₄₁N₃O₅) - inibidor de proteassoma

MMR: *Mismatch Repair* - reparo de pareamentos errados

mRNA: RNA mensageiro

mRNP: ribonucleoproteína mensageira

MS/MS: Espectrometria de massa em tandem

ncRNA: RNA não-codificante

NER: Reparo por excisão de nucleotídeos

NFX: Nifurtimox

NHEJ: *Non-homologous end joining*

NPG: Grânulo periférico nuclear

nt: Nucleotídeo

ORF: (*open reading frame*) Janela aberta de leitura

p34: *Protein Kinase 34*

p44: *Mitogen-Activated Protein Kinase 3*

p52: *Nuclear Factor Kappa B Subunit 2*

p62: *Sequestosome-1*

PABP: Proteína de ligação a poliadenilato

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCNA: (*Proliferating cell nuclear antigen*) Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PPIs: Interações proteína-proteína

PRP8: *Pre-mRNA-splicing factor 8*

PRPF3/4: *Pre-mRNA Processing Factor 3*

PSMC: *26S protease regulatory subunit 4*

PSMD: *Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 1*

RAD2: *DNA repair protein 2* - endonuclease

Rad23: *UV excision repair protein RAD23*

RBP: Proteína de ligação ao RNA

Reparo de ICL: Reparo de ligações covalentes estabelecidas entre as fitas complementares do DNA

R-loop: estrutura de ácido nucleico de três fitas, composta por um híbrido DNA: RNA e o DNA fita simples

RNA Pol II: RNA polimerase II

RNA: Ácido ribonucléico

RNAi: RNA de interferência

RNaseH1: Ribonuclease H1

RNaseH2A: Subunidade A da Ribonuclease H2

RPA: (*replication protein A*) Proteína de replicação A

RPB1: subunidade maior da RNA polimerase II do C-terminal

RRM: Motivo de reconhecimento de RNA.

rRNA: RNA ribossômico

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio.

SG: Grânulo de estresse

SL: *spliced leader*

snRNPs: complexos proteicos compostos por pequenos RNAs nucleares

SSB: Quebra de fita simples de DNA

ssDNA: DNA de fita simples

SUMO: *Small Ubiquitin-like Modifier Small nuclear ribonucleoproteins*

TAE: Tris-acetato EDTA

TC-NER: Sub-via do NER (*Transcription Coupled Repair*) Reparo acoplado à transcrição

TE: Tris-EDTA

TEP1: *Telomerase protein component 1*

TFII; A, F, H: Fator de transcrição da PolII; A, F, H.

TIA-1/R: *Nucleolysin TIA-1 isoform p40*

TLS: (*Translesion synthesis*) Síntese translesão

TOPBP1: *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*

TRAMP: complexo proteico formado por Mex67/Mtr2

TREX: complexo proteico de transcrição/exportação

tRNA: RNA transportador

USP7: Protease de processamento específico da ubiquitina - 7

UV-C: radiação ultravioleta com comprimento de onda entre 230 e 290 nanômetros

UV-DDB: *DNA damage-binding protein 1*

vtRNA: *Vault RNA*

WT: (*wilde type*) Tipo selvagem

XP(A-G): (*Xeroderma Pigmentosum*) Xeroderma pigmentosum – grupos de complementação de A, B, C, D, E, F e G

XRCC5: *X-Ray Repair Cross Complementing 5*

XRNA: homóloga da exoribonuclease 5'- 3' (Xrn1).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	24
1.2 BIOLOGIA MOLECULAR DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.3 A TRANSCRIÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	31
1.3.1 Iniciação e terminação da transcrição	33
1.3.2 Processamento do mRNA	34
1.3.3 Exportação do mRNA	35
1.3.4. Controle de Qualidade do mRNA	36
1.4 OS MECANISMOS MOLECULARES DE REPARO DE DNA	38
1.4.1 Reparo por Excisão De Nucleotídeos - NER	39
1.4.2 O NER em tripanossomatídeos	44
1.5 VIA DE SINALIZAÇÃO À RESPOSTA A DANOS AO DNA	48
1.5.1 Cinases ATM/ATR e o ciclo celular	48
1.5.2 Proteínas mediadoras da via de resposta a danos ao DNA.	52
1.5.3 Modificações pós-traducionais da via de resposta a danos ao DNA e o sistema ubiquitina-proteassoma.	54
2. OBJETIVOS	60
3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	61
3.2 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA NA PRESENÇA DE AGENTES GENOTÓXICOS	61
3.3 CURVAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DE AGENTES GENOTÓXICOS	62
3.4 TRATAMENTOS COM RADIAÇÃO UV	62
3.5 TRATAMENTO COM INIBIDOR DA RNA POLIMERASE	62
3.6 TRATAMENTO COM RADIAÇÃO GAMA E INDUÇÃO DA INIBIÇÃO DA TRANSCRIÇÃO	63
3.7 SINCRONIZAÇÕES DE CÉLULAS EM FASE G1 DO CICLO CELULAR	63
3.8 ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR POR FACS	64
3.9 OBTENÇÃO DE LINHAGENS SUPEREXPRESSORA DO GENE RNASEH1 E RNASEH2A DE <i>T. cruzi</i> .	64
3.9.1 Identificação das sequências gênicas e proteicas homólogas de hRNaseH1 e	64

hRNaseH2A em *T. cruzi*

3.9.2 Predição de domínios proteicos conservados nas sequências hipotéticas das TcRNaseH1 e TcRNaseH2A encontradas em <i>T. cruzi</i>	65
3.9.3 Amplificação das sequências gênicas homólogas RNaseH1 e RNaseH2A de <i>T. cruzi</i>	65
3.9.3.1 Iniciadores	65
3.9.3.2 Extração de DNA genômico	66
3.9.3.3 Amplificação dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A por reação de PCR	67
3.9.4 Clonagem dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A no vetor de manutenção pGEM-T-Easy	68
3.9.5 Subclonagem dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A ao vetor de superexpressão pROCK-Neo	69
3.9.6 Transformação bacteriana	70
3.9.7 Transfecção e seleção de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	70
3.10 AVALIAÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA SINALIZAÇÃO DE MORTE APÓS O TRATAMENTO COM AGENTE GENOTÓXICO EM <i>T. cruzi</i> .	71
3.10.1 Identificação da sequência gênica e proteica homóloga de hUSP7 em <i>T. cruzi</i>	71
3.10.2 Predição de domínios proteicos conservados nas sequências hipotéticas da suposta TcUSP7 encontrada em <i>T. cruzi</i>	71
3.10.3 Tratamento com inibidores da via ubiquitina-proteassoma	72
3.11 OBTENÇÃO DO ANTICORPO: ANTI-TcCSB	73
3.11.1 Expressão heteróloga da proteína recombinante TcCSB	73
3.11.2 SDS/PAGE	74
3.11.3 Preparação de amostra para espectrometria de massa	74
3.11.4 Espectrometria de Massa: MALDI-TOF/TOF	75
3.11.5 Imunização e obtenção do soro anti-TcCSB	75
3.12 WESTERN BLOT	76
3.13 IMUNOLocalização DA PROTEÍNA TcCSB POR IMUNOFLORESCÊNCIA	77
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	78
4. RESULTADOS	79

4.1 A TRANSCRIÇÃO ATIVA INFLUÊNCIA A RESPOSTA A DANOS NO DNA EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .	79
4.2 A TRANSCRIÇÃO INIBIDA POR IRRADIAÇÃO GAMA CONFERE RESISTÊNCIA À UV-C.	84
4.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> APRESENTA RESISTÊNCIA À EXPOSIÇÃO UV CICLO CELULAR FASE DEPENDENTE.	87
4.4 FENÓTIPO DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS SUPEREXPRESSORA E HEMINOCAUTE DO GENE RPA DE <i>T. cruzi</i> EM RESPOSTA AO ESTRESSE GENOTÓXICO INDUZIDO POR UVC.	90
4.5 IDENTIFICAÇÕES DOS SUPOSTOS HOMÓLOGOS DOS GENES RNASEH1 E RNASEH2A EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .	93
4.5.1 Domínios proteicos conservados na sequência das proteínas hipotéticas Tc.506351.40 e Tc.505939.60 supostas homólogas de RNaseH1 em <i>T. cruzi</i>.	95
4.5.2 Domínios proteicos conservados na sequência das proteínas hipotéticas Tc.510293.70 e Tc.508661.50 supostas homólogas de RNaseH2A em <i>T. cruzi</i>.	96
4.6 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS SUPEREXPRESSORA DO GENE RNASEH1 E RNASEH2A DE <i>T. cruzi</i> .	97
4.6.1 Clonagem e Subclonagem dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A.	97
4.7. FENÓTIPO DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS SUPEREXPRESSORAS DOS GENES DA RNASEH1 E DA RNASEH2A DE <i>T. cruzi</i> EM RESPOSTA AO ESTRESSE GENOTÓXICO INDUZIDO POR UVC.	102
4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA SINALIZAÇÃO DE MORTE APÓS O TRATAMENTO COM AGENTE GENOTÓXICO EM <i>T. cruzi</i> .	105
4.8.1 Identificação do suposto homólogo do gene USP7 em <i>T. cruzi</i>.	105
4.8.2 Domínios conservados na sequência da proteína hipotética conservada TC.CLB.510761.70 de <i>T. cruzi</i>.	106
4.8.3 A inibição da deubiquitinação influencia a resposta à UVC em <i>T. cruzi</i>.	107
4.8.4 A inibição do proteassoma não influencia a resposta UVC em <i>T. cruzi</i>.	110
4.9 OBTENÇÃO DO ANTICORPO: ANTI-TcCSB	113
4.9.1 Expressão heteróloga de TcCSB	113
4.9.2 Identificação da proteína TcCSB por espectrometria de massa.	115
4.10 WESTERN BLOT	119

4.11 CINÉTICA DA PROTEÍNA TcCSB APÓS IRRADIAÇÃO UVC POR IMUNOFLUORESCÊNCIA EM <i>T. cruzi</i> .	121
5. DISCUSSÃO	127
6. CONCLUSÃO	160
7. REFERÊNCIAS	161

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito protozoário flagelado, agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), pertence à ordem Kinetoplastida que inclui além do gênero *Trypanosoma*, o gênero *Leishmania*, protozoários digenéticos que possuem uma única mitocôndria em uma estrutura denominada cinetoplasto (DE SOUZA, 2002). A descoberta do *T. cruzi* ocorreu em 1908 pelo médico brasileiro Carlos Chagas ao observar a presença deste protozoário dentro dos triatomíneos que se escondiam nas paredes das habitações de Lassance, interior de Minas Gerais. Posteriormente, Chagas verificou que este parasito era capaz de infectar macacos e gatos, o que o levou a fazer exames sistemáticos no sangue dos moradores de Lassance, à procura do *T. cruzi* em humanos. Em 14 de Abril de 1909, Chagas finalmente encontrava o parasito no sangue de uma criança febril – Berenice, na época com dois anos de idade – fazendo assim a descoberta da enfermidade que levaria o seu nome (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, já esteve totalmente confinada à Região das Américas. Nas últimas décadas, o padrão epidemiológico da doença mudou de rural para predominantemente urbana, principalmente devido à mobilidade populacional, urbanização e emigração. Como consequência, um número crescente de casos foi detectado no Canadá, nos Estados Unidos da América, em muitos países europeus e alguns países da África, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental. Devido ao alto número de pessoas que permanecem sem diagnóstico ou tratamento, combinado com as áreas com transmissão ativa remanescente, coloca cerca de 75 milhões de pessoas em risco de infecção. Em maio de 2019, após decisão na 72ª Assembleia Mundial da Saúde, o Dia Mundial da doença de Chagas foi estabelecido e a data escolhida foi 14 de abril, o dia do primeiro diagnóstico humano da doença (WHO, 2020).

Na América Latina, o parasito *T. cruzi* é transmitido principalmente por contato com fezes ou urina do barbeiro. Os principais vetores da doença de Chagas (*Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi*, *Rhodnius*

prolixus e *Panstrongylus megistus*) estão amplamente distribuídos na América Latina, habitando tanto áreas florestais quanto secas (RASSI, JR., et al, 2012; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018). Assim, a transmissão vetorial, que ocorre pelo contato com as fezes contaminadas durante o repasto sanguíneo dos insetos vetores, é a principal forma de infecção com *T. cruzi* nas regiões endêmicas da doença. Além da via vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida de mãe para filho (transmissão congênita), por transfusão de sangue contaminado, transplante de órgãos infectados, pela ingestão de alimentos contaminados de caráter emergente (transmissão oral), (ALTCLAS, J. et al, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é considerado complexo, pois diferentes formas morfológicas com funções biológicas distintas se alternam entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero (Figura 1). Um triatomíneo infectado contém *T. cruzi* tripomastigotas metacíclicos na porção final de seu intestino. Enquanto se alimenta de sangue humano (ciclo doméstico) ou de outros animais (ciclo silvestre), o inseto defeca, liberando os parasitos que penetram no local da picada ou em mucosa íntegra. No ponto de entrada, os parasitos tripomastigotas metacíclicos infectam principalmente macrófagos e células epiteliais. Outros alvos do *T. cruzi* são fibras musculares cardíacas e lisas. Dentro das células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas que se dividem várias vezes por fissão binária no citoplasma celular, e em seguida se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas que rompem a célula infectada. Os parasitos tripomastigotas liberados podem infectar células vizinhas ou ir para a corrente sanguínea e infectar outros tecidos do corpo. Quando um triatomíneo se alimenta de sangue novamente, ingere os parasitos tripomastigotas sanguíneos. No intestino médio, estes parasitos se diferenciam em epimastigotas, que se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, reiniciando o ciclo (CHATELAIN, E. 2014; VANRELL, M. C. et al, 2017).

Do ponto de vista clínico, a doença de Chagas possui duas fases em humanos, a aguda e a crônica. A fase aguda inicia-se após a infecção e prolonga-se por dois a quatro meses. É possível observar uma intensa reação inflamatória no ponto de entrada do parasito, originando o chagoma de infecção ou o sinal de Romana. Contudo, a maioria dos pacientes apresentam sintomas leves, muito semelhantes aos de viroses comuns, como febre, mal-estar e linfadenopatia, o que dificulta a identificação dos indivíduos

infectados. A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por alta parasitemia, o que permite o seu diagnóstico por métodos diretos, como a microscopia do sangue, ou parasitológicos, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) (MALIK, L. H., et al, 2015; PÉREZ-MOLINA, J. A. et al, 2015). Nesta fase, há uma intensa resposta inflamatória com ativação da resposta imune inata (células *natural killer* e macrófagos) por citocinas pró-inflamatórias Th1, como fator de necrose tumoral α e interferon γ , e produção de anticorpos contra o *T. cruzi* (PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018).

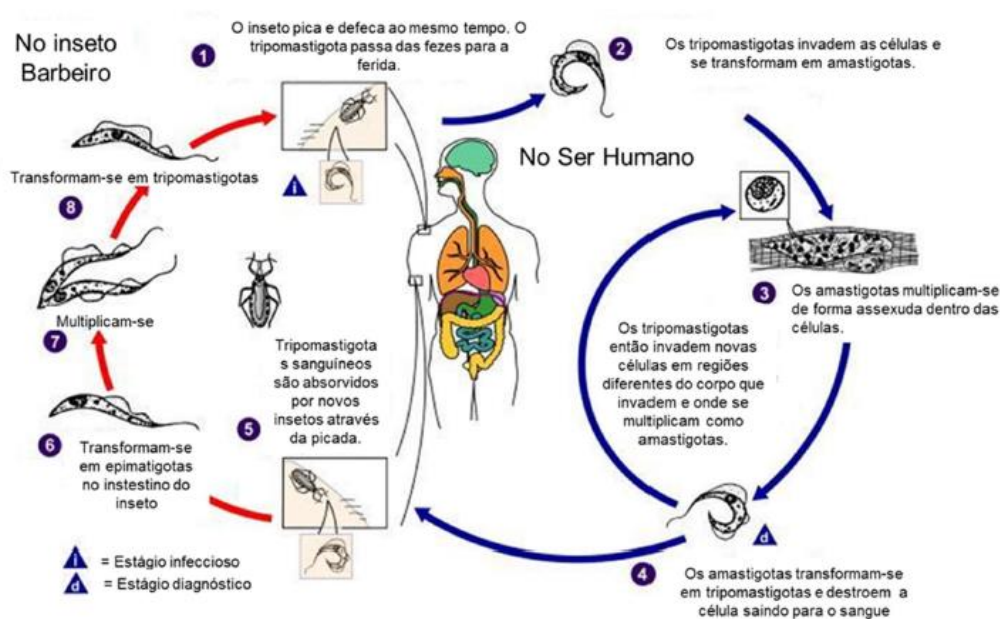


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*: Esquema mostrando as várias formas do parasito nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro deposita as fezes na pele do homem que se infecta com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após invadir as células, se transformam em amastigotas e se multiplicam. Em seguida, se transformam em tripomastigotas, caindo na corrente sanguínea, onde podem ser passados novamente para o barbeiro por meio de uma nova picada. No triatomíneo, o *T. cruzi* se transforma em formas epimastigotas e se multiplica, transformando-se em seguida em tripomastigotas. Figura adaptada de CDC – Center for Disease Control and Prevention.

Os tratamentos atualmente disponíveis são efetivos apenas durante esta fase da doença. Após a fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença de Chagas. Em muitos pacientes infectados não existem sinais físicos ou evidências clínicas de lesão a qualquer órgão, o que constitui a fase crônica indeterminada. Estes pacientes podem permanecer assintomáticos durante toda a vida, com taxas de sobrevivência semelhantes às de indivíduos não infectados (MALIK, L. H., et al, 2015). Depois de 20 a 30 anos sem sintomas, cerca de 40% dos pacientes desenvolvem a forma crônica sintomática,

caracterizada pelo comprometimento de alguns órgãos, principalmente o coração (forma cardíaca – Cardiopatia Chagásica Crônica) e o sistema digestivo (forma digestiva). Esporadicamente, ambos os sistemas podem ser afetados (forma mista), assim como o sistema nervoso (forma neurológica). Durante a fase crônica da doença de Chagas a parasitemia diminui e é possível detectar a presença de anticorpos IgG contra diversos antígenos de *T. cruzi* por métodos sorológicos, como ELISA e imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (PÉREZ-MOLINA, J. A. et al, 2015). Atualmente, existem duas drogas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol (BZ) e o nifurtimox (NFX). A administração destes medicamentos é eficiente apenas durante a fase aguda da doença. Devido aos efeitos colaterais causados por ambas as drogas, em muitos casos o tratamento precisa ser interrompido. Por ter uma melhor penetração no tecido, tolerabilidade, perfil de segurança e eficácia, o BZ é mais amplamente utilizado no tratamento (PÉREZ-MOLINA, J. A. et al, 2015).

Um estudo recente mostrou, pela primeira vez, a ocorrência de dormência em *T. cruzi* após infecção em células humanas e em camundongos. Ao analisar as células infectadas, e não tratadas com compostos tripanocidas, foi observado que alguns parasitos amastigotas espontaneamente pararam de se multiplicar. Contudo, tais parasitos são capazes de retomar a replicação, dias ou semanas após entrar em dormência, e se transformar em tripomastigotas, os quais podem infectar novas células hospedeiras. O tratamento com BZ por até 30 dias matou os amastigotas com replicação ativa, ao passo que os amastigotas transientemente dormentes sobreviveram e foram capazes de restabelecer infecções após o término do tratamento. Os autores do trabalho sugerem que a dormência do *T. cruzi* após a infecção é a principal causa da ineficiência do BZ e NFX para tratar a fase crônica da doença de Chagas. No entanto, os fatores que controlam este estado transiente de dormência ainda precisam ser elucidados (SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J., et al, 2018) e devem considerar a existência de uma diferença adaptativa entre as cepas de *T. cruzi* para gerar células dormentes, conforme descrito por Bruno Carvalho Resende e autores em 2020.

A diversidade clínica observada na doença de Chagas tem sido associada tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. Aspectos genéticos e imunológicos de cada paciente influenciam nos sintomas desenvolvidos. Tem sido demonstrado que polimorfismos em alguns genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro podem alterar tanto a

suscetibilidade ao *T. cruzi* quanto a severidade da doença de Chagas. O estado imunológico do paciente também afeta o curso clínico da doença, já que o processo de reconhecimento e internalização do patógeno, bem como a indução da resposta imune, são essenciais para lidar com a infecção causada pelo parasito (JIMÉNEZ, P., et al, 2018). É sabido que o *T. cruzi* apresenta uma grande diversidade genética e fenotípica intraespecífica. Diferentes linhagens deste parasito apresentam variações no conteúdo do DNA, número e tamanho de cromossomos, constituição antigênica, patogenicidade, suscetibilidade à droga e tropismo tecidual. Tais características podem influenciar a progressão clínica da doença de Chagas causada pelas diferentes cepas de *T. cruzi* (ZINGALES, B., 2018).

1.2 BIOLOGIA MOLECULAR DO *Trypanosoma cruzi*

A ordem Kinetoplastida é formada por um grupo de organismos que divergiu num passado evolutivo distante. Esses protozoários possuem uma arquitetura do DNA mitocondrial única, formada por uma rede de minicírculos e maxicírculos, denominada de kDNA (do inglês *kinetoplast DNA*), pois está inserido em uma organela, o cinetoplasto (SIMPSON, et al., 1980). Essa é uma organela que possui grande conteúdo de DNA e se localiza próximo ao corpo basal do flagelo dos tripanossomatídeos. Além disso, estes parasitos possuem uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário assume (Figura 2), (BRISSE et al., 2000). Existem diversos estudos relacionados à caracterização da diversidade genética em *T. cruzi*, tendo em vista que diferentes grupos desse parasito apresentam diferenças na sua morfologia, cinética de crescimento, tropismo celular, curso da infecção em modelos experimentais, susceptibilidade a quimioterápicos, constituição antigênica, propriedades bioquímicas e moleculares, dentre outros. (BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003).

Em um primeiro momento, foram sugeridas duas principais linhagens, *T. cruzi I* e *T. cruzi II* (MOMEN, 1999). Entretanto, estudos utilizando genes mitocondriais e nucleares, rDNA 24Sa, dentre outros, indicaram a existência de uma terceira linhagem denominada *T. cruzi III* (AUGUSTO-PINTO et al., 2003, DE FREITAS et al., 2006, MACHADO & AYALA, 2001). Em 2009, ZINGALES e colaboradores incluíram três novos grupos, *T. cruzi IV*, *V* e *VI*. Esses grupos incluíram, dentre outras cepas, as cepas

híbridas que não puderam ser agrupadas em nenhuma das linhagens definidas anteriormente e que agora foram classificadas como *T. cruzi* V e VI.

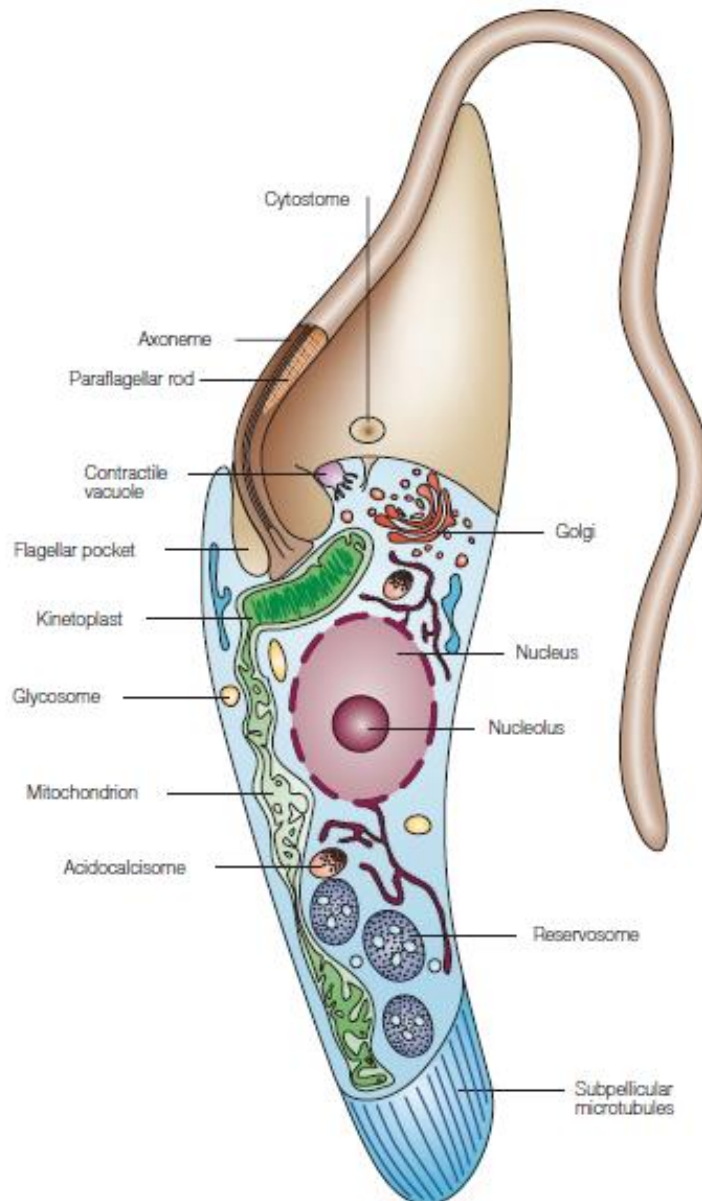


Figura 2: Representação esquemática de tripanossomatídeos: Representação esquemática de uma seção longitudinal da forma epimastigota de *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares, como o núcleo, a bolsa flagelar e a mitocôndria única contendo o DNA armazenado no cinetoplasto. Fonte: DOCAMPO, R. et al., 2005.

Assim, o *T. cruzi* foi definido como uma espécie clonal, cuja principal forma de reprodução é a assexuada, por meio de fissão binária. Neste contexto, acreditava-se que

novos clones evoluíram devido ao acúmulo de mutações discretas (ZINGALES, 2018). Contudo, a existência de linhagens naturalmente híbridas e a obtenção de clones híbridos em laboratório tem revelado que mecanismos de troca gênica são frequentes e importantes para a variabilidade intraespecífica deste parasito (GAUNT et al, 2003; ALVES, C et al, 2018). O termo unidade discreta de tipagem (DTU) foi proposto para descrever conjuntos de unidades populacionais que são geneticamente mais semelhantes entre si do que entre outras populações, e que podem ser identificadas por meio de marcadores moleculares e características biológicas (ZINGALES, B et al, 2012). De acordo com a nomenclatura mais utilizada atualmente, as diferentes linhagens do *T. cruzi* são divididas em seis DTUs, designadas de TcI a TcVI, e uma sétima DTU é chamada de TcBat. Nesta classificação, as DTUs TcV e TcVI referem-se às cepas híbridas (MARCILI et al, 2009; ZINGALES, B. et al, 2009). A linhagem CL Brener é um clone da linhagem CL isolada de um *T. infestans*, que é um vetor estritamente doméstico no Brasil (BRENER & CHIARI, 1963). O *T. cruzi* CL Brener é classificado como TcVI, que é uma cepa híbrida originada a partir dos ancestrais TcII e TcIII. Por ser uma linhagem bem caracterizada experimentalmente, a cepa CL Brener teve seu genoma sequenciado (EL-SAYED, et al, 2005).

A primeira versão de um genoma de *T. cruzi* CL Brener foi publicada em 2005 (EL-SAYED et al, 2005). Os genomas de *Leishmania major* (IVENS, A.C. et al., 2005) e *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) (BERRIMAN, M. et al., 2005) foram publicados simultaneamente no mesmo ano e suas análises revelaram que, ao contrário de *Leishmania major* ou *T. brucei* que tinha cerca de 20–25% das repetições no genoma, o *T. cruzi* apresentava cerca de 50%, tornando a análise e montagem do genoma mais difícil (EL-SAYED, N.M. et al., 2005). Portanto, esse primeiro genoma não atingiu a qualidade esperada e permanece incompleto, embora tenha sido a principal referência para muitos pesquisadores até hoje, apesar da crescente disponibilidade de novas e melhores sequências genômicas (HERREROS-CABELLO, A. et al., 2020).

As abordagens moleculares utilizadas para investigar as relações parasito-hospedeiro e a resistência e resiliência dos Kinetoplastideos a drogas e agentes genotóxicos têm revelado características biológicas únicas, provavelmente por terem divergido cedo na linhagem evolutiva que originou os demais eucariotos (VICKERMAN, 1994). Além do mais, desde a primeira descrição de um clone para um

gene em *T. cruzi* em 1986 (PETERSON et al., 1986) até a publicação do genoma completo de *T. cruzi*, os estudos moleculares nesse parasito avançaram gene por gene. Logo após o primeiro relato de um experimento de transfecção para *T. cruzi* publicado por LU & BUCK em 1991, os consecutivos avanços na criação de novos vetores, como aqueles contendo promotor rRNA (DaROCHA et al., 2004b), e para a obtenção de linhagem *single-knockout* via recombinação homologa dirigida por cassete de deleção vêm permitindo aprimorar as análises de genética reserva nesse organismo (PASSOS-SILVA, D. G. et al., 2010). Atualmente, novas técnicas de edição estão disponíveis, como a CRISPR-Cas9, que em tripanossomatídeos viabilizou os estudos de genes via *knockout* gênico de forma rápida e eficaz (BURLE-CALDAS, G. et al., 2018).

1.3 A TRANSCRIÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Todos os genomas de Kinetoplastida que foram estudados até o momento tem em geral uma estrutura genômica semelhante (EL-SAYED, N. M., et al. 2005; CLAYTON, C. 2016). Múltiplas janelas de leitura aberta (*ORF*) sem íntron são organizadas de uma forma *head-to-tail*, às vezes com repetições em tandem, e com apenas mudanças ocasionais de direção, normalmente dirigidos por uma única região promotora. Isso gera a transcrição de um RNA policistrônico. Os promotores não são típicos de outros eucariotos, e a maior parte da transcrição da RNA polimerase II inicia-se em trechos de DNA de vários quilobases que separam arranjos de genes orientados em direções opostas e divergentes. As unidades de transcrição policistrônica podem ter mais de 100 kb de comprimento. Embora a ordem do gene seja parcialmente conservada evolutivamente (JACKSON, A. P., 2008), unidades de transcrição contêm genes que não estão relacionados quanto com as funções das proteínas codificadas e o nível de expressão de seus mRNAs maduros também podem variar ao longo do ciclo de vida (CLAYTON, C. & MICHAELI, S. 2011; CLAYTON, C. 2019).

Em *T. brucei*, os telômeros carregam arranjos longos de genes VSG, glicoproteínas variantes de superfície e pseudogenes (MULLER, L. et al. 2018). A variação antigênica ocorre pela alternância na expressão dos genes de VSG. Um único VSG é ativo de cada vez através da transcrição pela RNA polimerase I de um dentre os vários genes presentes em diferentes sítios de expressão. Assim, a expressão de uma nova proteína pode ocorrer ou pela ativação de um promotor de um sítio de expressão

alternativo, como também por recombinação ou eventos de conversão de genes que mudam a sequência VSG dentro do sítio de expressão ativo (HORN, D. 2014).

1.3.1 Iniciação e terminação da transcrição.

A RNA polimerase II de tripanossomatídeos possui 12 subunidades que são homólogas de outros eucariotos. No entanto, os fatores de transcrição basais da polimerase II são mais divergentes e incluem tanto proteínas conservadas quanto novas (DAS, A. et al., 2008; SRIVASTAVA, A. et al., 2018) como, TBP (originalmente denominado TRF4), (RUAN, J. P. et al., 2004), TFIIB [19], a pequena subunidade TFIIA e outros fatores como as duas proteínas específicas do Kinetoplastídeos que pode formar o equivalente a TFIIF (SRIVASTAVA, A. et al., 2018; SCHIMANSKI, B. et al., 2005). Os locais de início da transcrição para mRNAs foram mapeados por purificação e sequenciados via RNAs 5'-trifosfatados. A maioria dos locais de início estão espalhados por regiões que separam unidades de transcrição divergentes, com sobreposições claras entre os locais de iniciação para cada direção; alguns locais de início, em vez disso, permitem a reinicialização sem uma mudança de direção (KOLEV, N. et al., 2010; WEDEL, C. et al., 2017). Os resultados dos experimentos de *run-on* indicam que o alongamento da transcrição é geralmente constitutivo (MARTINEZ-CALVILLO, et al., 2004) e os RNAs mensageiros maduros são individualizados após processamento do RNA policistrônico, onde uma sequência de RNA *spliced-leader*, transcrito em outra região do genoma, é inserido na extremidade 5' do RNA mensageiro.

O RNA precursor *spliced-leader* possui 142 nt, SLRNA, é o único transcrito da polimerase II que surge de genes com promotores e terminadores bem descritos (DAS, A. et al., 2005). A alta taxa de síntese de SLRNA necessária para *trans-splicing* é alcançada em parte pela presença de cerca de 100 cópias do gene SLRNA arranjadas como repetições em tandem (DE LANGE, T. et al., 1983). Em *T. cruzi*, esse arranjo resulta na concentração da RNA polimerase II em uma posição específica dentro do núcleo (DOSSIN, F. & SCHENKMAN, S. 2005).

Em Opisthokonts, o supergrupo eucariótico que inclui Fungos e Metazoa, a terminação da RNA polimerase II está ligada à poliadenilação. A clivagem do sítio Poli (A) parece ser suficiente para a terminação, mas a eficiência de terminação é aumentada pelas exoribonucleases Rat1/Xrn2 (LOYA, T. & REINESA, D. 2016). Este modelo de "torpedo" ligado a poliadenilação não é possível em um organismo com transcrição policistrônica. A transcrição da RNA polimerase II dos Kinetoplastídeos termina nas

regiões onde duas unidades de transcrição convergem ou em regiões transcritas por outras polimerases (por exemplo, genes de tRNA e rRNA), logo a montante dos genes do tRNA (SIEGEL, T. et al., 2009; MARCHETTI, M. A. et al 1998) ou genes transcritos da PolII e a montante do arranjo de SLRNA (REYNOLDS, D. et al., 2016).

As regiões de terminação da polimerase II de *T. brucei* são enriquecidas com histonas variantes H3V e H4V [31,50] e coesina (MULLER, L. et al. 2018). As histonas H3V e H4V também são enriquecidas próximo aos telômeros, que possuem cromatina compactada e não são transcritos pela polimerase II, (MULLER, L. et al. 2018). O mecanismo detalhado de terminação da polimerase II não foi investigado. Curiosamente, a proteína de ligação ao RNA nuclear RPB33 liga-se preferencialmente a RNAs de regiões onde convergem unidades de transcrição de polimerase II, e sua perda leva a um aumento considerável de RNAs que se originam da fita errada, bem como *retroposon* e RNAs repetidos (FERNANDEZ-MOYA, S. M. et al., 2014). Esses resultados implicam RBP33 na terminação. No entanto, não se sabe como RBP33 é recrutado para RNAs nascentes de regiões de terminação, ou como mRNA são marcados para degradação. Após a terminação da transcrição, o transcrito primário é processado em mRNAs individuais por *trans-splicing* com o capeamento *spliced leader* (SL), (MICHAELI, S. et al, 2011) e por poliadenilação (CLAYTON, C. & MICHAELI, S. 2011).

1.3.2 Processamento do mRNA

O *trans-splicing* foi descoberto pela primeira vez em tripanossomatídeos (DE LANGE, T. et al., 1984; KOOTER, J. & BORST, P., 1984), contudo, posteriormente foi descrito em diversos organismos (KRCHNÁKOVÁ, Z. et al., 2017). Os mRNAs maduros adquirem seu cap por meio de *trans-splicing*, onde um exon de 39 nt proveniente de um precursor RNA denominado *spliced-leader* é adicionado extremidade 5' de todos os mRNAs. O cap é metilado durante o *trans-splicing* (ULLU, E. & TSCHUDI, C. 1991) e a metilação da ribose é necessária para uma tradução eficiente (ZAMUDIO, J. et al., 2009). Adição do cap (SL-RNA) e sua metilação são co-transcricionais (MAIR, G. et al., 2000). A maquinaria de capeamento também está associada ao complexo de transcrição SLRNA em tripanossomatídeos, mas não se sabe como isso ocorre (BADJATIA, N, et al., 2013).

O *trans-splicing* dos tripanossomatídeos é mecanicamente semelhante ao *cis-splicing* com U2, U4, U5 e U6 snRNPs; mas o SLRNA snRNP toma o lugar do U1 snRNP. O complexo de poliadenilação é convencional, exceto por duas subunidades que não possuem homólogos relacionados em eucariotos (KOCH, H. et al., 2016). Por outro lado, a especificação do local de poliadenilação é não convencional, ao invés de conter um sinal de poliadenilação, o aparato proteico de processamento de poli-A "mede" uma distância específica a montante do trato de polipirimidina ativo esse mecanismo de 'medição' geralmente resulta no uso de um *cluster* de locais de poliadenilação alternativos, (KOLEV, N. et al., 2010; DILLON, L. A. et al., 2015; CAMPOS, P. C. et al., 2008). Logo, o processamento de RNAs depende do correto reconhecimento e exposição das sequências de RNA à maquinaria de *splicing* (LEE, Y. & RIO, D. C., 2015).

1.3.3 Exportação do mRNA.

O transporte do mRNA dentro da célula e a sua localização são mediados por proteínas ligadora de RNA (RBPs) que determinam o destino do mRNA de acordo com sua composição em um determinado complexo de mRNP (GERSTBERGER, S. et al., 2014; RE, A. et al., 2014). Em *T. cruzi*, o motivo de reconhecimento de RNA (RRM) é o domínio mais comum e versátil encontrado em RBPs, pois pode ligar-se a diferentes moléculas, como RNA e DNA de fita simples e dupla, e interagir com proteínas. Devido à sua plasticidade, as RBPs que contêm esse domínio são atores-chave no metabolismo do RNA, agindo desde o *trans-splicing* do mRNA até o *turnover* do mRNA (CLÉRY, A. et al., 2008; CLÉRY, A & FRÉDÉRIC, H., 2012). Em metazoários e fungos, as diferentes espécies de RNA são exportadas do núcleo por vias especializadas. Por exemplo, o tRNA é exportado por *exportin-t* de um modo dependente de RanGTP. Em contraste, os mRNAs estão associados a ribonucleoproteínas (RNPs) e exportados por um complexo de transporte essencial (TAP-p15 em humanos, Mex67-mtr2 em leveduras) que transporta mRNA através do poro nuclear (SERPELONI, M. et al., 2011). Como esperado, o RNAi direcionado a *T. brucei* MEX67 ou seus parceiros de interação MTR2 e importina 1 (DOSTALOVA, A. et al., 2013), causa o acúmulo de poli (A)-RNAs no núcleo. Além do mais, um estudo de hibridização *in situ* demonstrou que em tripanosomas a exportação de mRNA pode começar antes que a extremidade 3'

tenha sido sintetizada (GOOS, C. et al., 2018), ocorrendo de forma co-transcricional. Assim, após o processamento, os mRNAs devem ser transportados para o citoplasma (BJÖRK, P. & WIESLANDER, L., 2017) e, uma vez lá, os mRNAs maduros podem ser sequestrados para a máquina de tradução para síntese de proteínas ou armazenados em grânulos de RNA, onde serão mantidos em silêncio ou direcionados para degradação (CLAYTON, C. 2019).

1.3.4. Controle de Qualidade do mRNA

Os agentes genotóxicos são capazes de gerar lesões no DNA que afetam a transcrição ao desacelerar a progressão de Pol II, comprometendo assim a fidelidade da transcrição via Pol II ou mesmo bloqueando totalmente sua translocação (NAEGELI & SUGASAWA, 2011), levando a parada da transcrição e interrompendo a síntese do mRNAs nascente que estão sendo co-transcricionalmente processados (GOOS, C. et al., 2018; FADDA A, 2014). O comprometimento de etapas do pré-processamento do mRNA podem prejudicar o *trans-splicing*, e levando a produção de mRNAs capeados e poliadenilados que contêm mais de um quadro de leitura aberto, unido pela região intergênica (oligo-cistrônicos) e esses podem se acumular e escapar para o citoplasma (KRAMER, S. et al., 2016). Em tripanossomatídeos, o silenciamento do exossomo, complexo de degradação de RNA, resultou em acúmulo de tais mRNAs não corretamente processados no citoplasma (KRAMER, S. et al., 2012), o que sugere que tais mRNAs podem ser direcionados para destruição pelo exossomo, refletindo seu papel no controle de qualidade e degradação de mRNA defeituosos. O exossomo de RNA é um complexo de exoribonucleases com atividade 3`- 5´ que possui em sua estrutura central as exonuclease Rrp6 e a exonuclease/endonuclease Rrp44 que é responsável pelo reconhecimento do substrato e desenrolamento do RNA (WASMUTH, E. V. & LIM, C. D., 2012). Em tripanossomatídeos, o papel principal do exossomo é provavelmente no núcleo, especialmente no controle de qualidade de RNAs não processados corretamente e seu exossomo está associado apenas a uma única exoribonuclease, RRP6, (HAILE, S. et al 2007; KRAMER, S. et al., 2016).

Em *T. brucei* os autores examinaram um mRNA muito longo (22 kb) e descobriram que após a inibição do *trans-splicing* via tratamento com sinefungina, uma versão processada em 5´ que não tinha uma extremidade 3´ ficou presa no canal do poro

nuclear (GOOS, C. et al., 2018). Isso indica que o maquinário de exportação reconhece extremidades 5' processadas de mRNAs, em vez da cauda poli (A) (ELISEEVA, I. A. et al., 2013). *T. brucei* possui duas proteínas de ligação poli (A), PABP1 e PABP2 (DA COSTA LIMA, T. et al., 2010); a associação de PABP2 com o CBP (*nuclear cap-binding complex*), (ZOLTNER, M. et al., 2018; KRAMER, S. et al., 2013), sugere que PABP2 pode acompanhar novos mRNAs não processados do núcleo ao citoplasma.

Desse modo, quando o *trans-splicing* é inibido, grânulos contendo mRNAs não processados se acumulam na periferia nuclear, embora este grânulo contenha duas enzimas que estão envolvidas diretamente no decaimento de mRNAs, nenhum intermediário de decaimento de mRNA foi encontrado, levantando a hipótese de que este grânulo mantém a separação das enzimas de degradação do *pool* de mRNAs no citoplasma, regulando o decaimento do mRNA de forma global (KRAMER, S. et al., 2012; GOOS, C. et al., 2018). No entanto, apesar da importância do controle translacional e do controle da estabilidade do mRNA na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, a conexão entre a transcrição e formação dos grânulos de mRNP e a regulação do ciclo de vida permanece desconhecida nesses parasitos. O mecanismo que distingue os mRNAs destinados ao armazenamento ou degradação no *T. cruzi* parece depender da combinação de diferentes componentes proteicos associados aos mRNAs, de acordo com seus níveis de expressão durante o ciclo de vida, corroborando a complexidade do processo de regulação da expressão gênica (ROMAGNOLI, B. A. A. et al., 2020).

1.4 OS MECANISMOS MOLECULARES DE REPARO DE DNA

O DNA está constantemente exposto a diversos tipos de danos induzidos por agentes genotóxicos endógenos e exógenos. Agentes endógenos compreendem principalmente os subprodutos das vias metabólicas, tais como os compostos reativos do oxigênio e nitrogênio (PLUSKOTA-KARWATKA et al., 2008; MARNETT & PLASTARAS, 2001). Agentes exógenos ou fatores ambientais, como radiação ionizante (raios X e raios γ), radiação UV (ultravioleta) e agentes químicos podem causar, respectivamente, quebras duplas das ligações fosfodiéster; dímeros de pirimidina ciclobutano e 6-4 fotoprodutos; formação de *crosslinks*, danos nas bases nitrogenadas do DNA e/ou distorções no arcabouço de açúcar-fosfato. A instabilidade da ligação glicosídica, entre a pentose e o anel da base, pode causar a perda da base, resultando em sítiosapurínicos ou apirimidínicos (ou sítios AP) (HOEIJMAKERS, 2001). Finalmente, os danos no DNA podem ser gerados por enzimas do próprio metabolismo celular, tal como ocorre na formação de erros de pareamento do tipo U:G, através da atuação da enzima AID (*Activation-induced cytidine deaminase*), durante o processo de diversificação de receptores de antígenos, nos linfócitos B maduros dos mamíferos (JANKOVIC et al., 2007). Se esses danos gerados no DNA não são reparados, eles podem ocasionar mutações e resultar em disfunção celular (DE BOER, 2002).

O reparo do DNA é um processo bioquimicamente complexo, o qual emprega inúmeras proteínas que atuam na remoção das lesões e na manutenção da integridade do genoma. Sabe-se que a habilidade de um organismo de se reproduzir está fortemente relacionada ao desafio de copiar fielmente o seu genoma, além de manter sua estabilidade após sucessivos ciclos de divisão celular (DE BOER, J. G. 2002). As principais vias relacionadas ao reparo do DNA em eucariotos são: (1) sanitização do pool de nucleotídeos, (2) a reversão direta das modificações de base, que não requer molde para a síntese de DNA e tem como função principal a remoção de grupos metil anômalos ou dímeros de timina, sem causar quebra na dupla hélice; (3) retirada de (i) bases incorporadas erroneamente no DNA recém-replicado pelo reparo de erro de pareamento (ou MMR do inglês *Mismatch Repair*), (ii) danos volumosos por meio de reparo por excisão de nucleotídeos (ou NER do inglês *Nucleotide Excision Repair*), e (iii) bases modificadas pelo reparo por excisão de base (ou BER do inglês *Base*

Excision Repair). O DNA também é suscetível a quebras duplas (ou DSBs do inglês *Double Strand Breaks*) que podem ser reparados por recombinação homóloga (ou HR do inglês *Homologous Recombination*) ou *non homologous end joining* (NHEJ). Mesmo que estes mecanismos reparem a maioria das lesões no DNA, alguns destes danos permanecem, levando ao bloqueio da maquinaria de replicação (LAGERWERFA, S, et al., 2011.; HOEIJMAKERS, 2001; DE BOER, 2002).

Alternativamente, algumas DNA polimerases especializadas podem adicionar nucleotídeos através de moldes contendo lesões. Esse processo, conhecido como síntese translesão (ou TLS, do inglês *Translesion Synthesis*) aumenta a probabilidade de erros de replicação, gerando mutações no DNA (HOEIJMAKERS, 2001). Finalmente, há o reparo de *crosslinks* inter-fitas (ICLs, do inglês *Interstrand CrossLinks*) cujas lesões resultam da ligação covalente entre as duas fitas opostas do DNA, o que leva ao bloqueio de atividades celulares que dependem da separação entre as fitas, como a replicação do DNA e a transcrição e requer a colaboração de múltiplas proteínas de diferentes vias de reparo para sua resolução, incluindo proteínas da recombinação homóloga, do NER, do BER e da síntese translesão (revisado em MUNIANDY, et al., 2010). Estas vias operam de maneira coordenada de forma a minimizar o dano na informação genética. Como consequência, a perda de um destes mecanismos pode levar a um acúmulo de mutações e/ou morte celular (DE BOER, 2002, GILL & FAST, 2007).

1.4.1 Reparo por Excisão De Nucleotídeos - NER

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é responsável por remover uma ampla variedade de lesões no DNA, incluindo adutos pesados covalentemente ligados ao DNA e outras formas de dano que causem alguma distorção na estrutura da dupla hélice (NAEGELI & SUGASAWA, 2011). Defeitos do NER em humanos estão associados à síndrome de alta propensão ao câncer, *Xeroderma Pigmentosum* (XP) e a síndromes que comprometem o desenvolvimento, *Síndrome de Cockayne* (CS) e *Tricotiodistrofia* (TTD) (LEHMANN, 2001; VERMEULEN et al., 2001; EMMERT et al., 2009; CAMERONI et al., 2010). O sistema NER pode ser dividido em duas vias principais: reparo por excisão de nucleotídeos no genoma global (GG-NER) que detecta lesões distribuídas em todo o genoma e reparo acoplado à transcrição (TC-NER), via

que reconhece lesões capazes de bloquear a RNA polimerase, garantindo que genes ativos tenham maior prioridade para serem reparados que o resto do genoma, figura 3, (NOUSPIKEL et al., 2009),

Durante o GG-NER em humanos, a proteína XPC, juntamente com as proteínas RAD23 e centrina-2 (ARAKI et al., 2001; NISHI et al., 2005), reconhecem segmentos de fita simples de DNA associados a lesões que distorcem a estrutura da dupla hélice (MIN & PAVLETICH, 2007). A proteína XPC humana é composta de 823 resíduos de aminoácidos, de caráter muito hidrofílico e possui um domínio ácido próximo à região N-terminal, um sinal putativo de localização nuclear e um sítio de glicosilação (LEGERSKI & PETERSON, 1992). O recrutamento de XPC aos sítios de lesão pode ser auxiliado pelo dímero UV-DDB, composto pelas proteínas DDB1 e DDB2 (ou XPE), sendo que esta última reconhece especificamente lesões induzidas por UV (FELDBERG & GROSSMAN, 1976; CHU & CHANG, 1988).

O mecanismo pelo qual XPC reconhece lesões em qualquer parte do genoma começa a ser elucidado. Estudos recentes mostraram que Rad4, homólogo de XPC em leveduras, reconhece lesões de forma indireta, através da inserção de uma estrutura em beta-hairpin entre a dupla hélice levando à exposição da fita lesada em uma conformação aberta. A preferência pela abertura de trechos contendo lesões ao invés de DNA intacto é resultante da desestabilização das pontes de hidrogênio nesta região em decorrência do dano, aliado ao impedimento estérico que uma distorção na dupla hélice causa à livre difusão da proteína ao longo da molécula de DNA, durante a busca por lesões. O aumento do tempo de permanência da proteína associado à diminuição da energia necessária para o rompimento das ligações de hidrogênio desestabilizadas é o que favorece a abertura da dupla hélice neste ponto (CHEN, et al., 2015).

Após o reconhecimento da lesão por XPC e UV-DDB, ocorre a associação do fator de transcrição TFIIH ao local do dano no DNA. O fator de transcrição TFIIH é um complexo composto por dez diferentes proteínas, dividido em dois sub-complexos: o cerne, contendo as helicases XPB e XPD, além de mais cinco outras proteínas associadas (p62, p52, p44, p34 e p8/TTD-A); e o CAK, complexo ativador de cinase (COMPE & EGLY, 2012). TFIIH é então recrutado pela interação de XPC com as

proteínas XPB e p62, iniciando o processo de excisão pela abertura da dupla hélice em torno do sítio de dano.

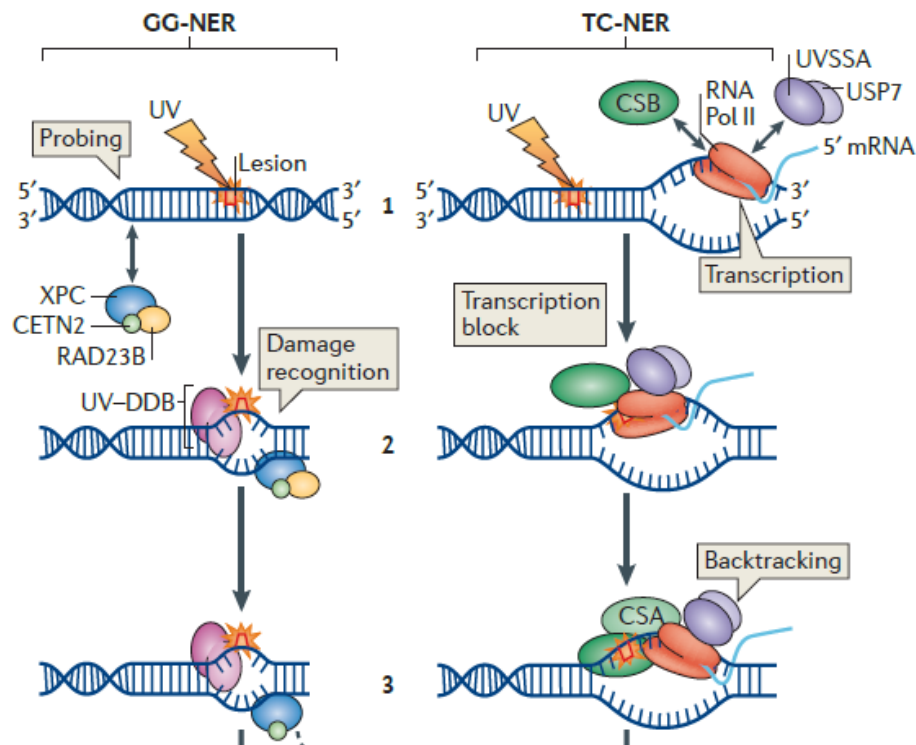


Figura 3: Reparo por Excisão de Nucleotídeos: Reparo de excisão de nucleotídeos. GG - NER (esquerda); subvia, o sensor de danos XPC, em complexo com RAD23 e centrina 2 (CETN2), constantemente sonda o DNA para lesões que distorcem a hélice (passo 1, esquerda), que são reconhecidas com a ajuda da radiação UV-DDB (etapa 2, esquerda). Após a ligação o complexo XPC ao dano, o RAD23 dissocia-se do complexo (passo 3, esquerda). TC-NER; direita, subvia acoplada a transcrição, o dano é indiretamente reconhecido durante o alongamento do transcrito pelo bloqueio da RNA polimerase II em uma lesão. Durante o alongamento do transcrito UVSSA e USP7 e CSB interagem transitoriamente com RNA Pol II (etapa 1, direita). Ao parar em uma lesão, a afinidade de CSB para RNA Pol II aumenta (passo 2, direita) e complexo CSA – CSB é formado, o que provavelmente resulta em reversão translocação (*backtracking*) da RNA Pol II (passo 3, à direita) que torna a lesão de DNA acessível para reparo. Fonte: MARTEIJN, J. A. et al., 2014.

Tanto XPB, quanto XPD atuam no processo de abertura da fita dupla de DNA em torno da lesão, onde XPD é crucial para a atividade de helicase e XPB promove a hidrólise de ATP (OKSENYCH & COIN, 2009). Após a separação das fitas do DNA, ocorre a associação de RPA, para assegurar a estabilização da bolha. XPA é também recrutada com o propósito de estabilizar o complexo TFIIH-XPC e promover a

liberação do sub-complexo CAK, o que coincide com a chegada das endonucleases XPF/ERCC1 e XPG, que realizarão, respectivamente, incisões a 5' e a 3' da lesão, levando à remoção do oligonucleotídeo contendo a lesão. O corte a 3' da lesão ocorre após o recrutamento de RFC (*Replication Factor C*) e PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que coordenarão o acesso da maquinaria de replicação ao sítio de reparo. O preenchimento do espaço deixado pela saída do oligonucleotídeo contendo a lesão é realizado pelas DNA polimerases delta (Pol δ) e kappa, em células quiescentes, e pela DNA polimerase épsilon (Pol ϵ), nas células em divisão. Após a ação das DNA polimerases, as quebras remanescentes são seladas pelas DNA ligases I ou III, nas células em divisão e nas células quiescentes, respectivamente (FAGBEMI et al., 2011).

O TC-NER difere do GG-NER durante o passo de reconhecimento da lesão no DNA, o qual é realizado através do reconhecimento da parada da RNA polimerase no sítio da lesão em genes transcricionalmente ativos no genoma. O bloqueio da RNA polimerase II, e talvez da RNA polimerase I, pela lesão no DNA, aumenta a sua afinidade com a proteína CSB (*Cockayne syndrome type B*). O gene humano CSB (ERCC6) codifica uma proteína de 168 kDa e 1493 aminoácidos, pertencente à família SWI2/SNF2-ATPase, que possivelmente atua como a proteína Mfd bacteriana ao estimular a translocação da RNA polimerase ao longo da fita de DNA, permitindo com que o complexo TFIIH tenha acesso ao local do dano. Adicionalmente, CSB possui uma região acídica, uma região rica em glicina, duas sequências putativas de endereçamento nuclear e um domínio de ligação de nucleotídeos. CSB também está envolvido no remodelamento da cromatina e faz parte do complexo de alongação da RNA polimerase II (TROELSTRA et al., 1992; VAN GOOL et al., 1997; ANINDYA et al., 2010).

A partir do passo de reconhecimento da lesão, as sub-vias TC-NER e GG-NER convergem para a mesma via bioquímica, (figura 4). No caso do TC-NER, a transcrição pode ser abortada, caso a RNA polimerase se desligue da fita molde, ou pode retornar, caso o complexo enzima-substrato mantenha-se estável, o que pode requerer a ação de CSA, que provavelmente possui ação antagônica a CSB (HANAWALT & SPIVAK, 2008). A interação de XPG com CSB e a RNA polimerase II também poderia permitir com que o NER ocorra sem a liberação da RNA polimerase (SARKER et al., 2005). Entretanto, caso não ocorra à remoção das lesões pelo NER, a RNA polimerase pode inserir nucleotídeos frente às lesões e estender além do sítio da lesão de forma propensa

a erros. Tal processo é descrito como mutagênese transcricional (TM), em que a transcrição através da fita molde danificada levaria à formação de transcritos contendo mutações. Embora a produção de transcritos contendo mutações possa ser tóxico para a célula, este processo resgata as células da morte, uma vez que a parada da RNA polimerase é um forte sinal para a apoptose (SAXOWSKY & DOETSCH, 2006; BREGEON & DOETSCH, 2011).

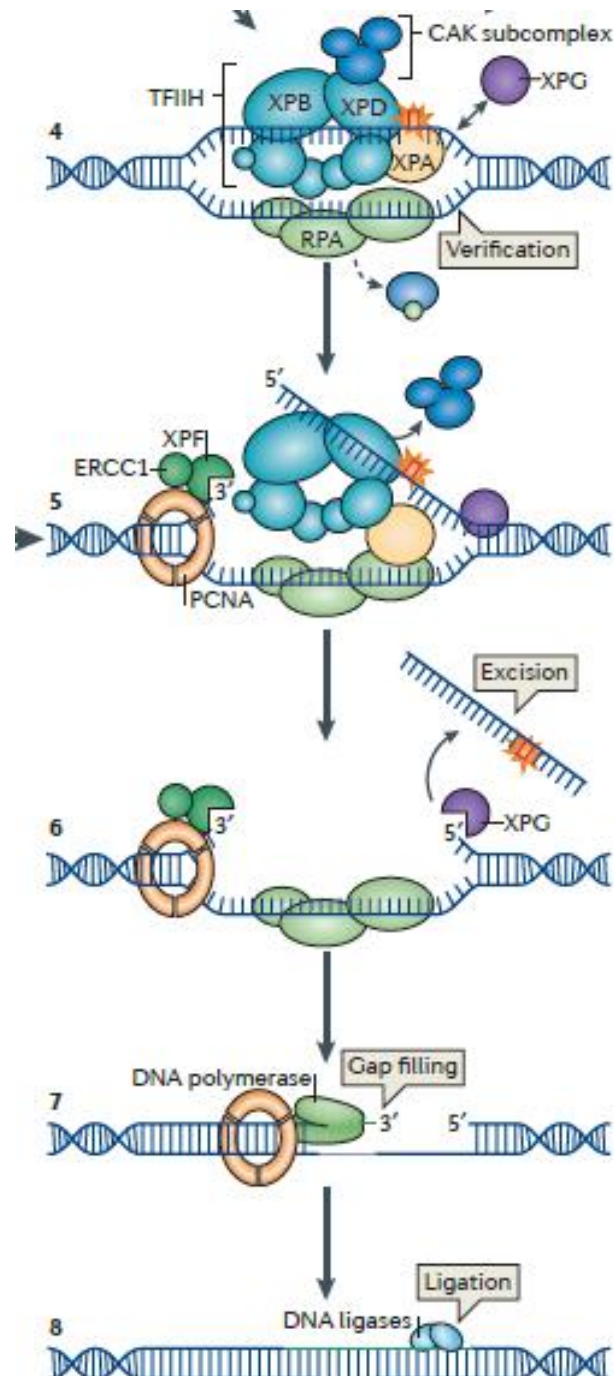


Figura 4: Convergência das etapas finais das subvias GG-NER e TC-NER: Após o reconhecimento do dano, o TFIIH é recrutado para a lesão em ambos os GG - NER e TC - NER (passo 4). No NER, o

XPG associada com TFIIH ou separadamente, liga-se ao complexo NER pré-incisão (passo 4). Após ligação de TFIIH, o CAK (cinase de ativação de CDK) dissocia-se do núcleo do complexo TFIIH. A atividade da helicase de TFIIH abre ainda mais a dupla hélice ao redor da lesão 5' – 3' desenrolamento do DNA. A atividade ATPase da subunidade TFIIH XPB e XPA, liga-se a nucleotídeos de cadeia simples que são quimicamente alterados. (Passo 4). Nesta etapa, a RPA também é recrutada e reveste o fio não danificado. XPA recruta XPF-ERCC1, que é direcionado para a fita danificada pela RPA para criar uma incisão 5' à lesão (passo 5). Uma vez que este "ponto de não retorno" é atingido, XPG é ativado e corta o dano na posição 3' para a lesão, que excede a lesão dentro de um oligonucleotídeos (passo 6). O PCNA, que é carregado diretamente após a incisão de 5' por XPF-ERCC1, recruta DNA Pol δ , DNA Pol κ ou DNA Pol ϵ para DNA de preenchimento de *gap* (passo 7). O preenchimento de lacunas pode começar imediatamente após a incisão de 5' feita. A reação do NER está completa através da selagem do *nick* final por DNA ligase 1 ou DNA ligase 3 (passo 8). Fonte: MARTEIJN, J. A. et al., 2014.

1.4.2 O NER em tripanossomatídeos.

O NER em tripanossomatídeos deve operar em um cenário muito particular em relação ao que acontece nos demais eucariotos, uma vez que a maior parte de seus genes, que codificam para proteínas, está organizada em unidades policistrônicas, contendo apenas um promotor. Como descrito anteriormente, tais unidades, ao serem transcritas, geram um único transcrito primário multigênico, que originará mRNAs maduros, através do processo de *trans-splicing* (DANIELS et al., 2010; CLAYTON, C. 2019). Em consequência do baixo número de promotores, os quais provavelmente permanecem constitutivamente ativos, a transcrição nestes parasitos é uniforme e extensiva ao longo de todo o genoma (SIEGEL et al., 2009). Esta aparente perda de controle pré-transcricional é única, considerando-se que a proporção de um promotor para cada gene e variadas taxas de transcrição constituem o padrão de controle da expressão gênica entre os eucariotos.

Em *T. cruzi*, com exceção do reparo por ligação de extremidades não homologas (NHEJ) todas as vias de reparo de DNA estão presentes (PASSOS-SILVA et al., 2010), e influenciam a sobrevivência do parasito. A via NER é amplamente conservada nos tripanossomatídeos, embora o sequenciamento do genoma desses parasitos tenha revelado pequenas diferenças em relação a outros organismos onde esta via é bem caracterizada (MENDES, I. 2015). Por exemplo, foi observado a ausência de ortólogos para as proteínas RPA3 (componente do heterotrímero RPA), XPA, CSA e DDB2, sendo que esta última constitui a subunidade menor do dímero UV-DDB (BERRIMAN

et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005; PASSOS-SILVA et al., 2010). Além disso, é possível identificar duas proteínas similares a XPB, nomeadas como XPB e XPBz (BADJATIA et al., 2013). Outra diferença perceptível é a ausência do complexo CAK em TFIIH, que em tripanossomatídeos está associado a duas proteínas exclusivas desse grupo, denominadas TSP1 e TSP2 (LEE, J. H. et al., 2009). Além disso, a ausência da ligase 3 (LIG3) pode inferir que, em tripanossomatídeos, a via NER funcione dependente da ligase 1 apenas (LIG1). As implicações dessas alterações para o funcionamento do NER em tripanossomatídeos ainda são desconhecidas, visto que a dissociação de CAK do complexo TFIIH é um passo crítico para o recrutamento de XPF/ERCC1 e XPG ao sítio da lesão (COIN et al., 2008).

Em 2015, nosso grupo de pesquisa na autoria de Mendes e colaboradores, com o intuito de avaliar o envolvimento das duas subvias de NER no metabolismo de DNA em *T. cruzi*, construíram linhagens heminocaute e superexpressora dos genes codificantes das proteínas responsáveis pela etapa de reconhecimento da lesão: TcXPC (*Xeroderma Pigmentosum Group C Protein*), para o GG-NER e TcCSB (*Cockayne Syndrome B Protein*), para o TC-NER. Descrevendo que, após a exposição à radiação UV e à cisplatina, identificou-se que apenas a subvia TC-NER está envolvida na resposta aos danos gerados por estes agentes, influenciando a sobrevivência imediata do parasito à exposição UVC. Esses estudos do TC-NER em *T. cruzi* revelou que o excesso de TcCSB (linhagem superexpressora) é capaz de direcionar essas células para a morte após o tratamento com altas doses de UVC, por outro lado, descreve que a linhagem heminocaute correlaciona-se a uma taxa de sobrevivência maior do que a observada na linhagem selvagem irradiada. Esses resultados denotam a importância do nível adequado de TcCSB na célula para a resposta a danos gerados por UV, uma vez que as linhagens estudadas se distinguem entre os fenótipos de sobrevivência e morte, figura 5 (MENDES. I. C. 2015).

Em *T. brucei*, o TC-NER é a principal via de reparo do NER, sendo que CSB, XPBz e XPG contribuem majoritariamente. Além disso, foi mostrado que as lesões UV são reparadas de forma ineficiente em *T. brucei*, talvez devido ao uso preferencial da síntese de translesão de RNA polimerase. RNAi de XPC e DDB foi considerado letal e esses fatores atuam no reparo de ICLs. Além do mais, TbCSB e TbXPBz desempenham uma função importante na sobrevivência de *T. brucei* após a exposição ao UV, uma vez

que o RNAi contra esses dois genes resultou em um aumento pronunciado na morte celular em relação aos controles não induzidos por RNAi. Um fenótipo similar foi observado pelo aumento da sensibilidade à cisplatina e o aumento da persistência de lesões de cisplatina em células individuais após RNAi de TbCSB, assim esses dados indicam que o reparo da cisplatina é impedido pela perda de TbCSB (MACHADO, C. R. et al., 2014; LECORDIER, L. et al., 2007; BADJATIA, N. et al., 2013).

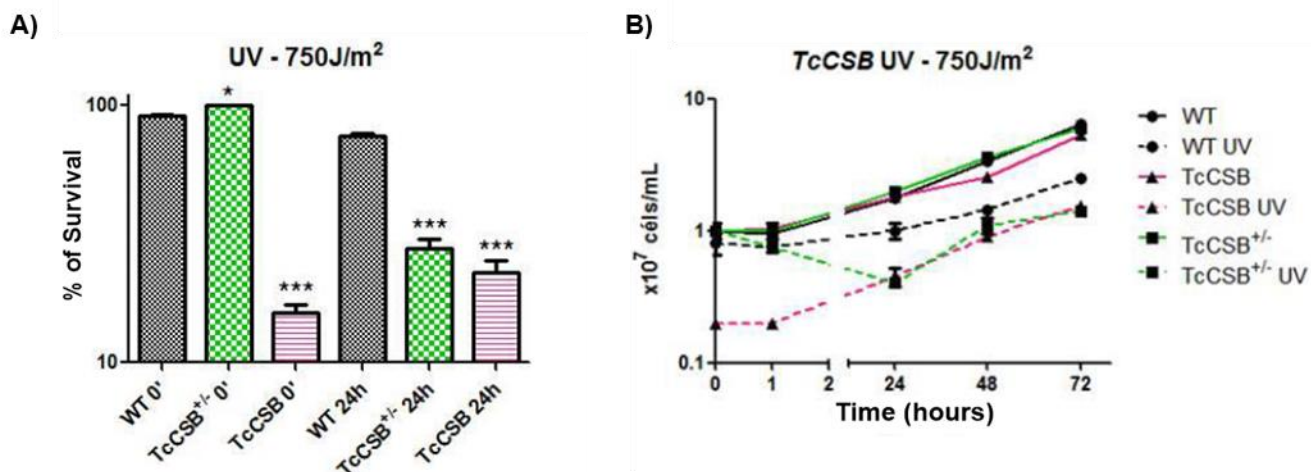


Figura 5: Análise do fenótipo das linhagens celulares de *T. cruzi* após radiação UV. A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo CL Brener selvagem (barra cinza), heminocaute (barra verde) e superexpressora de TcCSB (barra roxo) tratadas com 750 J/cm². Nos tempos, 0 e 24 horas após UV. A sobrevivência foi determinada para a linhagem controle e desafiadas com UV. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. B) Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo CL Brener selvagem (linha preto tracejada), heminocaute (linha verde tracejada) e superexpressora de TcCSB (linha roxo tracejada.) tratadas com 750 J/cm². Durante os tempos de 0, 1, 24, 48 e 72 horas.

Em *T. brucei* a transcrição após o dano é afetada por CSB. Os níveis de mRNA de genes nos policistrons foram medidos em seguida ao RNAi de TbCSB e exposição à radiação UV ou cisplatina. Na ausência de danos ao DNA, o RNAi de TbCSB reduziu a abundância de mRNA de três dos quatro genes mais distais do início da transcrição. O tratamento com UV, na ausência de TbCSB RNAi, causou o mesmo efeito nestes três transcritos e, adicionalmente, levou a pequenos aumentos nos níveis de mRNA dos dois genes mais próximos ao início da transcrição (dentro de ~ 10 kbp; 2890 e 2940). Tomados em conjunto, esses dados mostram que o dano UV ou ausência de TbCSB afeta a abundância de mRNA, mas de maneiras complexas, possivelmente dependendo da localização dentro de um policistron. Esses dados sugerem que a perda de TbCSB

aumenta a estabilidade dos mRNAs na presença de danos UV (MACHADO, C. R. et al., 2014).

De forma geral, os estudos sobre a biologia molecular dos tripanossomatídeos mostram que ao longo da evolução esses organismos desenvolveram estratégias eficazes de sobrevivência, como a capacidade de lidar com danos ao DNA gerados pelo próprio metabolismo, assim como, danos exógenos (SLUPPHAUG et al., 2003), demonstrando fenótipos celulares de alta resiliência a agentes genotóxicos. As informações anteriores sobre danos ao DNA que levam a parada da RNA polimerase II e o impedimento do processo de transcrição ativa indicam que a transcrição policistrônica em *T. brucei* e *T. cruzi* resultou em adaptação pronunciada do NER. E assim, conferiu a TcCSB um papel importante para o reparo de lesões de forma eficiente. De modo que os níveis de TcCSB na célula podem influenciar a sobrevivência celular após tratamentos com cisplatina e UV (MENDES, I. 2015). Desse modo, a importante função de TcCSB contempla a especificidade do processo de transcrição em *T. cruzi* a fim de assegurar a integridade dessa via de informação atuando no reconhecimento da RNA polimerase colapsada frente à lesão e na inicialização do TC-NER. Considerando essas relações descritas anteriormente, nossos resultados nos levaram a questionar qual o papel da transcrição ativa na sinalização de morte imediata descrita após UV?

1.5 VIA DE SINALIZAÇÃO À RESPOSTA A DANOS AO DNA.

1.5.1 Cinases ATM/ATR e o ciclo celular.

A célula integra os processos de reparo de DNA com transcrição e apoptose em uma via que é conhecida como a Resposta a Danos ao DNA (DDR, *do inglês DNA damage response*) que é orquestrada por proteínas do *checkpoint*, cinases e modificações pós-traducionais que auxiliam a reconhecer quando o DNA está danificado e iniciam a resposta celular ao dano, além de manter a estabilidade do genoma (LAGERWERFA, S. et al, 2011; BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008; LANS, H. et al., 2019). Na DDR a resposta é desencadeada por proteínas sensores especializadas no reconhecimento específico de cada tipo de lesão. A detecção do dano é então sinalizada por proteínas mediadoras, através de interações física ou funcional com proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais. A partir daí proteínas efetoras executam a resposta que podem incluir modificação da cromatina (WANG et al., 2012), expressão de genes envolvidos no reparo de DNA (YOUSEFZADEH & WOOD, 2013), parada do ciclo celular (GRANDIN & CHARBONNEAU, 2013) ou até morte celular (HUANG, J. et al., 2012). Dessa forma, ocorrência de danos ao DNA e a escolha do sistema de reparo a usar depende tanto do tipo de lesão quanto da fase do ciclo celular da célula. Por exemplo, uma quebra de fita dupla de DNA (DSB) nas fases S e G2 serão prontamente reparadas por recombinação homóloga (HR) utilizando as cromátides irmãs (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). No entanto, à medida que as células progridem para G2/M, os cromossomos são condensados em uma estrutura de cromatina altamente ordenada o que dificulta a busca por homologia e a HR. Nesse caso, o reparo por NHEJ ocorre na fase G1 subsequente, caso o *checkpoint* e DDR não induza a parada do ciclo celular durante as fases G2 e M, (FRANCHITTO, A., et al, 2003; DEMING, P. B., et al, 2002).

A resposta celular ao dano no DNA é controlada pela família da proteína cinase relacionada à *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases* (PIKK) incluindo ATR (*Ataxia telangiectasia e Rad3*) e ATM (*Ataxia telangiectasia mutada*) cinases (figura 6) (TRESINI, M. et al, 2015; 2016). As células *Seckel* (ATR-defeituosa) e A-T (com deficiência de ATM) exibem sinalização prejudicada devido a defeitos na reparação e ativação do *checkpoint* celular. Diversos estudos implicaram que *gaps* de ssDNA (DNA

de fita simples) causados por danos por UV resultam na ativação de vias de reparo e *checkpoint* dependentes de ATR (LAGERWERFA, S. et al, 2011). Além disso, durante a fase S, a forquilha de replicação ao encontrar lesões de CPD e 6-4PP provoca a parada da replicação nas quebras de fita simples (SSBs). Essas quebras são processadas para ssDNA longo, onde RPA se liga e inicia o recrutamento de uma série de proteínas de resposta a danos no DNA (DDR), incluindo o complexo ATRIP-ATR, TopBP1, MRE11, Rad50, Rad17 e complexo 9-1-1 (CORTEZ, D. et al., 2005; ZOU, L. et al., 2001). Se não resolvido, a forquilha de replicação colapsada leva à formação de DSBs. O complexo Mre11 / Rad50 / Nbs1 (MRN) reconhece os DSBs resultantes e facilita o recrutamento e a ativação de ATM. O complexo MRN inicia a ressecção de extremidades de DSB. As caudas de ssDNA resultantes procuram por homologia e invadem a cromátide-irmã para reparo mediado por recombinação homóloga (HR) (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008).

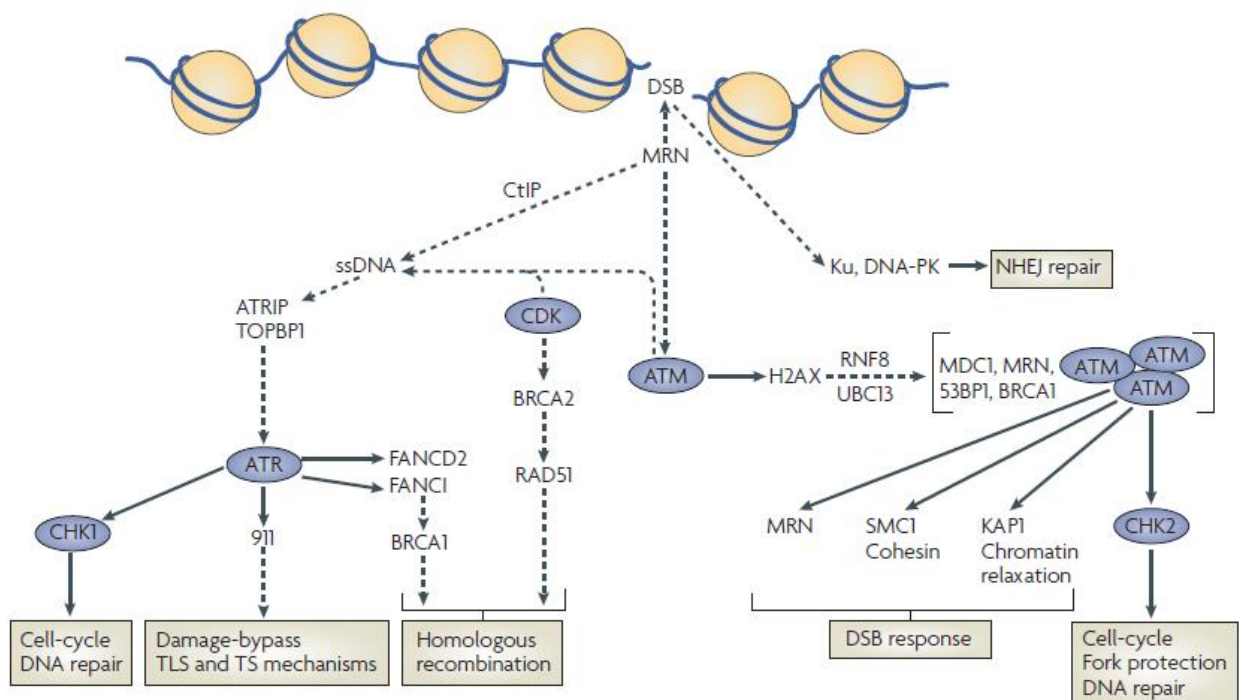


Figura 6: Os processos reguladores mediados por ciclina dependente de quinase e o *checkpoint* influenciam as vias de reparo do DNA: Ku e o complexo MRE11 – RAD50 – NBS1 (MRN) se ligam a DSBs e ativam as quinases DNA-PK e ATM, respectivamente. A Ku e a DNA-PK promovem o reparo de junção não final homóloga (NHEJ) de DSBs. Durante as fases S e G2, as DSBs são aparadas para expor o DNA de cadeia simples (ss) e ativar a ATR. O ATM ativado induz mudanças na cromatina ao redor do local do DSB através da fosforilação da histona H2AX, o que leva ao recrutamento de muitos fatores de *checkpoint* e reparo, como MDC1 e MRN. Esses fatores promovem o recrutamento de 53BP1, BRCA1 e da própria ATM para facilitar a disseminação do sinal de dano pelo núcleo. A fosforilação mediada por

ATM de KAP1 induz o relaxamento da cromatina, enquanto outras modificações promovem reparo. A fosforilação mediada por ATM e ATR de CHK2 e CHK1 promove a paragem do ciclo celular e a reparo do DNA e reduz a atividade da cinase dependente de ciclina (CDK). Vários alvos de ATM e ATR são necessários para a recombinação homóloga (HR). O complexo de pontos de verificação de danos ao DNA Rad9-Rad1-Hus1 (911) promove mecanismos de *bypass* de dano por síntese translesão (TLS) e *switch model* (TS). As setas indicam eventos de fosforilação direta. Setas tracejadas indicam eventos indiretos. Fonte: BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008.

A ativação de ATR e ATM leva à fosforilação de proteínas centrais à resposta a danos no DNA, CHK1 e CHK2. CHK1 e CHK2, por sua vez, regularão os mecanismos efetores da DDR, promovendo a modulação de funções celulares relacionadas a vias de apoptose, reparo de DNA, parada do ciclo celular e remodelamento da cromatina (ZHOU & BARTEK, 2004). A localização de ATR e ATM e a fosforilação de H2AX nos locais da lesão ocorrem dentre os dez minutos iniciais em células assíncronas e também paradas em G1, mostrando que o reparo e o *checkpoint* mediado por ATR e ATM começam cedo após irradiação UV. Além disso, dados demonstraram que o recrutamento de ATR e ATM e a fosforilação de H2AX são dependentes de proteínas NER na fase G1, mas não em S. Na fase S, quando as lesões UV resultam na parada da forquilha de replicação e na ssDNA longa, o recrutamento de ATR e ATM para esses locais é regulado por diferentes conjuntos de proteínas. Assim, dados fornecem evidências de que a ativação de ATR induzido por UV e a ativação de ATM diferem nas fases G1 e S devido à existência de tipos distintos de lesões de DNA que promovem a montagem de diferentes proteínas envolvidas no processo de reparo de DNA e ativação do *checkpoint* (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). No entanto, em um ensaio para quantificar a cinética do NER em função do ciclo celular em *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a deficiência do homólogo de ATR e Mec1 ou de quaisquer outras proteínas envolvidas na resposta celular ao estresse replicativo anula significativamente o NER, exclusivamente durante a fase S (BÉLANGER, F., et al, 2016).

Considerando o fato de que lesões estruturalmente diferentes são reparadas por vários mecanismos e de uma maneira específica do ciclo celular, a compreensão dos aspectos mecânicos que influenciam a eficiência do reparo é altamente relevante para definir a base da instabilidade do genoma e da via de sinalização à resposta a danos ao DNA (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008; LANS, H. et al., 2019). Desse modo, nosso grupo de estudo busca elucidar alguns eventos relacionados à DDR em *T. cruzi*. E os dados ressaltam o papel das cinases ATM e ATR nesse parasito, uma vez que a sinalização para morte imediata em células expostas à UVC é dependente dessas

cinases. Quando inibidas por cafeína (inibidor de cinases ATM/ATR) ou inibidor específicos de ATM (KU-60019) e ATR (VE821) as células irradiadas são resgatadas da morte. Além do que, em células superexpressoras de TcCSB a inibição dessas cinases também resgatou essas células da morte. Demonstrando que a sinalização de resposta a danos ao DNA para o TC-NER ocorre via cinases ATM/ATR em *T. cruzi* (figura 7) (MENDES, I. 2015).

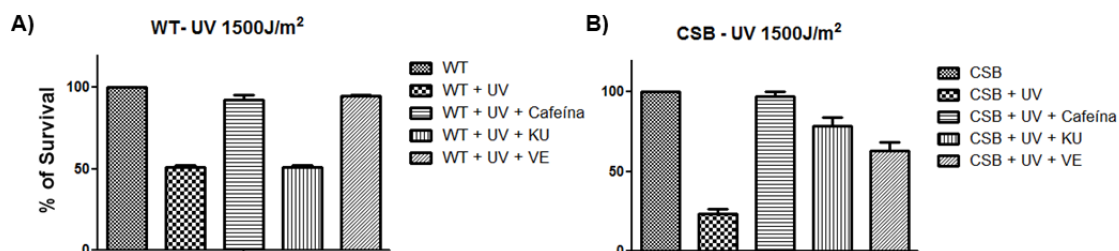


Figura 7: Análise do fenótipo das linhagens celulares de *T. cruzi* após radiação UV sob efeito da inibição de cinases. A) A taxa de sobrevivência foi determinada para a linhagem controle (WT) e desafiadas com UV (WT+UV) e também sob o efeito da inibição de cinases ATM e ATR. A taxa de sobrevivência foi determinada para a linhagem WT desafiadas com UV (WT+UV) pré- tratadas com cafeína (WT+UV+Cafeína), inibidor de ATM (KU-60019 – WT+UV+KU) e inibidor de ATR (VE821 – WT+UV+VE). Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. **B)** A taxa de sobrevivência foi determinada para a linhagem superexpressora de TcCSB (CSB) e desafiadas com UV (CSB+UV) e também sob o efeito da inibição de cinases ATM e ATR. A taxa de sobrevivência foi determinada para a linhagem superexpressora de TcCSB desafiadas com UV (CSB+UV) pré- tratadas com cafeína (CSB+UV+Cafeína), inibidor de ATM (KU-60019 – CSB+UV+KU) e inibidor de ATR (VE821 – CSB+UV+VE). Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão.

A análise do tipo de morte após UV descrita pelo nosso grupo demonstra que a morte rápida observada após o tratamento com UV é sinalizada em *T. cruzi* e envolve a exposição de fosfatidilserina à camada externa da membrana celular nas primeiras 4 horas, indicando que a morte celular ocorre principalmente por via apoptótica. Desse modo, a morte celular observada em *T. cruzi* após UV-C é sinalizada pela célula, (ASSIS, A. 2018) em consonância com o que foi descrito para *T. brucei* onde maiores níveis de morte celular após UV estão associados à exposição de fosfatidilserina à camada externa de células sanguíneas (VIEIRA-DA-ROCHA, J. P. et al., 2019). Assim, a morte observada após UV é sinalizada pela célula de modo dependente de ATM/ATR. No entanto, em *T. cruzi* as correlações da via de resposta a danos ao DNA e as fases do ciclo celular para os fenótipos celulares após UV ainda é pouco conhecida, em especial para o TC-NER.

1.5.2 Proteínas mediadoras da via de resposta a danos ao DNA.

Trabalhos recentes têm demonstrado a participação da proteína RPA (*Replication Protein A*) ligadora de fita simples de DNA na via de Resposta a Danos ao DNA (DDR, *do inglês DNA damage response*). A fita revestida por RPA (RPA-ssDNA) constitui um sinal fisiológico essencial para ativar essa via, sendo o complexo alvo-chave um importante regulador das modificações pós-traducionais na DDR. A RPA reveste rapidamente o ssDNA que é gerado durante a ressecção do DNA e os filamentos de RPA-ssDNA são fosforilados por ATR (CICCIA E ELLEDGE, 2010; MARECHAL E ZOU, 2015). Embora a fosforilação de RPA seja induzida em resposta a danos no DNA e seja frequentemente usada como sinal para a ressecção de DSB, as células que expressam mutantes fosfomiméticos de RPA apresentam defeitos na recombinação e reparo de DNA (BINZ et al., 2004). Em células humanas tratadas com radiação ionizante, tanto ATR quanto RPA encontram-se co-localizadas em focos nucleares pontilhados nas células em fase S e G2 e a translocação de RPA nessas fases é dependente de ATR (BARR, M. S., et al, 2003). Assim, há correlações entre a proteína RPA e ATR na via de resposta a danos ao DNA de acordo com as fases do ciclo celular.

A função de RPA na via de resposta a danos ao DNA também é descrita durante a geração de um duplex curto (~ 8-10 bp) RNA-DNA dentro do "complexo de transcrição". Essa estrutura pode surgir durante a parada da RNA polimerase diante de um dano na fita de DNA, a molécula de RNA recém-sintetizada pode se parear com a fita de DNA molde, formando uma estrutura composta por um híbrido de DNA/RNA e uma fita simples de DNA deslocada. Tal estrutura é denominada *R loop* e tem sido implicada em diversas condições fisiológicas celulares deletérias (ROY et al, 2010; SANTOS-PEREIRA e AGUILERA, 2015). Porém, caso os híbridos DNA/RNA sejam formados, esses podem ser desfeitos pela ação de enzimas RNases H que degradam a porção de RNA que interage com o DNA (SANTOS-PEREIRA, J. M. & AGUILERA, A, 2015). Ademais, os mutantes RNaseH1 defeituosos para ligação à RPA não digerem de forma eficiente os híbridos de RNA-DNA *in vivo* e acumulam *R-loops*, resultando em instabilidade genômica (NGUYEN, H. D. et al., 2017). Assim, foi proposto que a interação RPA-RNaseH1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados ao *R-loop* e, além disso, que o RPA reconhece os *R-loops* antes de serem

convertidos em quebras de fita dupla (NGUYEN, H. D. et al., 2017; BELOTSEKOVSKII, P. B. et al., 2018).

Em *T. cruzi*, foi demonstrado que RPA é importante para o reparo do DNA e assume um padrão nuclear pontuado após tratamento com hidroxirúria em comparação com um padrão nuclear disperso em células controle (PAVANI, R. S. et al. 2016). Em *T. brucei*, a intensidade de fluorescência de RPA1 aumentou no núcleo após o dano ao DNA gerado por irradiação ionizante, alcançando um pico máximo uma hora após o tratamento de IR (MARIN, P. A. et al., 2018). No entanto, não há evidências da participação de TcRPA para a via de sinalização a danos ao DNA em *T. cruzi* no contexto do estresse transcricional e suas possíveis correlações com TcATM/TcATR e a resolução de *R-loops*. Em *T. brucei*, tentativas de gerar mutantes nulos para RNase H2A não tiveram êxito, indicando que tal proteína é essencial para este parasito (BRIGGS, E. et al, 2019). Por outro lado, a perda da RNase H1 não é letal e resulta no acúmulo de danos em regiões ativamente transcritas, bem como no aumento das lesões no genoma associadas à replicação (BRIGGS, E. et al., 2018).

Desse modo, a revelação de correlações entre colisões da replicação com a transcrição e formação de *R-loop* estabelece um novo nível de complexidade na biologia de *R-loop*, em particular a associação com vias de resposta de dano de DNA mediadas por ATR e ATM (HAMPERL, S. et al., 2017). Em *T. brucei* a co-síntese de DNA e RNA potencialmente gera conflitos entre replicação e transcrição, o que pode levar à instabilidade genômica. Os conflitos de replicação-transcrição foram descritos por Marcelo da Silva e colaboradores em 2019 e relata que γ H2A e *R-loops* se co-localizam nas fases S/G2 tardias do ciclo celular de modo dependente da transcrição ativa. Logo, γ H2A e focos de *R-loops* são gerados no mesmo local, talvez em uma região propensa a conflitos de replicação-transcrição. Além do mais, foi descrito que o tratamento com RNase H foi capaz de diminuir a intensidade fluorescente dos *R-loops*. Juntos, esses achados sugerem que *R-loops* estão contribuindo para as lesões endógenas de DNA apresentadas por *T. brucei* (DA-SILVA, M. et al., 2019).

No entanto, trabalhos relacionados às funções das RNaseH1 e RNaseH2A em *T. cruzi* no contexto do estresse transcricional após UV ainda não são conhecidos. Da mesma forma que as possíveis interações entre essas proteínas com a TcRPA na

resolução cooperativa de *R-loops* e de sinalização celular para o reparo acoplado a transcrição, permanecem desconhecidas. Assim, nesse trabalho realizamos estudos dos homólogos dos genes TcRPA, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A de *T. cruzi* para a compreensão das suas funções e correlações com os fenótipos celulares após UV.

1.5.3 Modificações pós-traducionais da via de resposta a danos ao DNA e o sistema ubiquitina-proteassoma.

A via de sinalização de resposta a danos ao DNA (DDR - do inglês: *DNA damage response*) para o TC-NER inclui modificações pós-traducionais que ocorrem em proteínas, tais como RNAPol II e CSB. Essas modificações são eventos de processamento que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos. As modificações pós-traducionais mais conhecidas para a DDR do TC-NER incluem fosforilação, SUMOilização e ubiquitinação. Estas modificações podem determinar a atividade, a localização, e interações com outras proteínas (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). Numerosos processos celulares são regulados pelas modificações pós-tradicionais incluindo degradação de proteínas via proteassoma, regulação do ciclo celular e o reparo de DNA (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015), transcrição, sinalização e endocitose (CHEN, Z.J. & L.J. SUN. 2009).

A adição e remoção de ubiquitina (ubiquitinação/deubiquitinação) foram recentemente demonstradas como mecanismos gerais para regular as funções proteicas. A ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos, é usada para controlar estabilidade proteica, translocação e atividade (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015). A ubiquitinação proteica é um processo de várias etapas requerendo a ação sequencial de três enzimas: as enzimas ativadoras da ubiquitina (E1s) ativam ubiquitina que é subsequentemente carregada em enzimas conjugadas com ubiquitina (E2s); E2 então recruta a proteína alvo, para complexos com ubiquitina ligase (E3) que finalmente liga covalentemente a peptídeo de ubiquitina ativado para o resíduo de lisina da proteína alvo, figura 8 (LANS, H. et al., 2019; CHITALE, S & RICHLI, H, 2017; BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015; DYE, B.T. & B.A. SCHULMAN. 2007).

Vários fatores do NER estão sujeitos à extensiva regulação por ubiquitinação e deubiquitinação (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015). Assim, o equilíbrio entre as

ligases E3 e as atividades da enzima deubiquitinante podem alterar dinamicamente a deubiquitinação nos locais de dano ao DNA, regulando assim a eficiência do NER. CRL4^{DDB2} e CRL4^{CSA} são duas ligases de E3 da ubiquitina CRL4 mais bem estudadas envolvidas no NER, com DDB2 e CSA sendo os receptores de substrato dessas ligases, respectivamente (SCRIMA, A., et al., 2008; FISCHER, E.S., et al., 2011). A cristalografia da estrutura de CRL4^{CSA} E3 ligase apresenta uma alta semelhança estrutural com a da CRL4^{DDB2} E3 ligase. O substrato mais conhecido para a ligase E3 de CRL4^{CSA} é o CSB. CSA não apenas interage com o CSB, mas também é necessário para a degradação do CSB induzida por UV via proteassoma. Ensaio de ubiquitina *in vitro* demonstram ainda que o CRL4^{CSA} ubiquitina CSB (FISCHER, E.S., et al., 2011). Em resumo, a ligase CRL4 E3 é utilizada no passo de reconhecimento de lesão de DNA tanto em GG-NER como em TC-NER e está ainda envolvida em modificações de histona para facilitar o reparo de danos de DNA induzidos por UV (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015).

A ubiquitinação é um processo dinâmico e reversível. Uma família de enzimas conhecidas como DUBs (deubiquitinases) desempenham papéis críticos no processamento do precursor da ubiquitina e remoção da ubiquitina das proteínas alvo (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015). DUBs são proteases que catalisam uma reação proteolítica entre um grupo Lys ϵ -amino e um grupo carboxila correspondente ao C-terminal da ubiquitina, removendo assim a ubiquitina ligada covalentemente de proteínas para controlar a estabilidade e a atividade do substrato. Os DUBs mantêm o equilíbrio da dinâmica de ubiquitinação para controlar a estabilidade, atividade e localização da proteína substrato. Ao fazer isso, as DUBs estão envolvidas em uma infinidade de funções celulares, incluindo a homeostase celular, vias de sinalização, transcrição, modificação de histonas e vias de reparo de DNA (CLAGUE, M.J., COULSON, J. M., URBE, S., 2012).

A protease USP7 (*Ubiquitin Specific Peptidase7*) é uma das enzimas deubiquitinantes bem conhecidas devido à sua relevância para a via Mdm2-p53 (ROY, N., et al., 2010). A USP7 também demonstrou desempenhar um papel na resposta ao dano por UV regulando eventos em GG-NER e TC-NER (KEE, Y & HUANG, T. T., 2016). A USP7 está implicada na GG-NER por meio da deubiquitinação de XPC. Como mencionado anteriormente, o XPC é o fator de reconhecimento de danos no DNA do

GG-NER. Ele é ubiquitinado pela ligase CRL4 E3 ou RNF11 quando as células são irradiadas com UV, ainda que a ubiquitinação de XPC não conduza a degradação proteossomal significativa (HE, J., et al., 2014).

A USP7 também regula o TC-NER interagindo com o UVSSA e controlando a estabilidade do CSB/ERCC6 e RNA pol II. A síndrome de sensibilidade a ultravioleta é um distúrbio humano associado ao TC-NER, pela ausência de CSB e/ou UVSSA. Curiosamente, USP7 é encontrada em interação com UVSSA usando espectrometria de massa e ensaio de co-imunoprecipitação, sugerindo um papel de USP7 no TC-NER. A USP7 pode regular a ubiquitinação de proteínas TC-NER e estabilizar a RNA polimerase II (CHITALE, S & RICHLI, H, 2017). Em primeiro lugar, a USP7 reside em cromatina danificada com fatores TC-NER de maneira dependente de UV, e seu recrutamento é provavelmente através de sua interação com a UVSSA. A depleção de USP7 leva a uma redução na recuperação da síntese de RNA e desestabilização da proteína CSB, como visto nas células UVSSA-*knock-out* (CHITALE, S & RICHLI, H, 2017; ZHANG, X., et al., 2012). Portanto, a USP7 é fornecida pela UVSSA à vizinhança dos fatores TC-NER para regular seu *status* de ubiquitinação. Em segundo lugar, a RNA pol II parada na lesão induzida por UV é estabilizada, iniciando assim o TC-NER, figura 8. O RNA pol II é ubiquitinado, a depleção de UVSSA ou USP7 também desestabiliza o RNA polIII (NAKAZAWA, Y., et al.,2012). Em resumo, USP7 e UVSSA cooperam para controlar a estabilidade de CSB e RNA pol II para assegurar o TC-NER e uma retomada eficiente da transcrição (KEE, Y & HUANG, T. T., 2016).

O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) é um dos principais sistemas proteolíticos presentes em todas as células eucarióticas. Proteínas poli-ubiquitinadas são subsequentemente reconhecidas e degradadas pelo proteassoma (KOURANTI, I. & PEYROCHE, A. 2012). O UPS desempenha papéis cruciais em uma grande variedade de funções celulares essenciais, assim como, a manutenção de proteínas do TC-NER, como relato anteriormente. O proteassoma 26S é o elemento mais a jusante do UPS e é responsável pela degradação de proteínas. Compreende a parte central catalítica (partícula CP ou 20S) com um ou duas partes reguladoras (RP, 19S ou PA700), os sítios ativos de protease estão localizados dentro do CP (KOURANTI, I. & PEYROCHE, A. 2012).

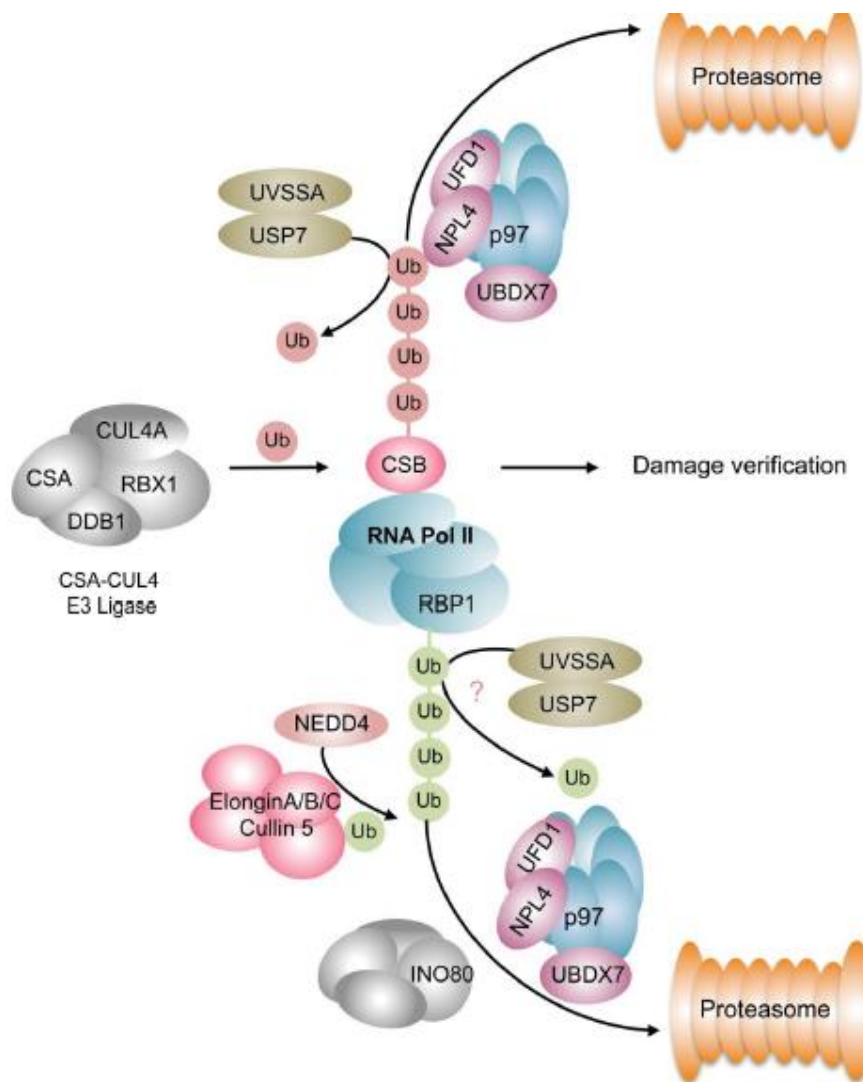


Figura 8: Eventos de ubiquitinação durante TC-NER: CSB é ubiquitinado pela ligase E3 de CSA-CUL4 causando a sua segregação mediada por p97 e degradação proteassomal. Este processo é neutralizado pelo complexo UVSSA-USP7 que catalisa a deubiquitinação do CSB. A subunidade RBP1 de RNA Pol II sofre ubiquitinação, ligada a K63, que é provocada por uma reação de dois passos envolvendo NEDD4 e o complexo Elongin E3 ligase. A polimerase ubiquitinada é extraída da cromatina pelos complexos de segregase INO80 e p97, levando-a à degradação proteassomal. Isso é presumivelmente neutralizado pelo complexo UVSSA-USP7. As esferas verdes representam a ubiquitinação ligada ao K63, as esferas vermelhas indicam uma ubiquitinação ligada ao K48. Fonte: CHITALE, S & RICHLI, H, 2017.

Após a irradiação UV, a proteína CSB é degradada em um estágio tardio do processo de reparo de uma maneira dependente do proteassoma e do CSA. Essa degradação de CSB é requerida para a recuperação da síntese de transcrição. Além disso, na presença do inibidor de proteassoma MG132, CSB pode ser detectado em associação com CSA em todos os momentos, sugerindo que o seu desaparecimento após a irradiação UV é uma consequência da degradação proteassomal. Assim, o CSB liga-se

ao CSA nos estágios iniciais do reparo do DNA e é subsequentemente removido do complexo CSA pela degradação dependente do proteassoma nos estágios posteriores (GROISMAN, R., et al 2006).

Em *T. cruzi* o bloqueio da atividade proteassomal bloqueia a replicação do parasito e a diferenciação celular, assim como, a proteólise dependente do proteassoma que ocorre durante a diferenciação (metacicloênese). No entanto, a degradação mediada por ubiquitina e o perfil de conjugados ubiquitinados foi semelhante em todas as fases de diferenciação (CARDOSO J, L., et al., 2011). Além do mais, a inibição do proteassoma leva ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas, como descrito por DIEGO, J. L., et al., 2001. O papel do UPS e suas correlações com os mecanismos de reparo de DNA em *T. cruzi* têm sido abordadas pelo nosso grupo de pesquisa e conforme relatado por CERQUEIRA, P. G., et al, em 2017, a inibição do proteassoma aumenta o tempo de parada do crescimento celular induzida por IR e a proteólise mediada pelo proteassoma é alterada. Assim, foi demonstrado que há relação entre o UPS e a sinalização de resposta a danos ao DNA após irradiação ionizante. No entanto, as bases moleculares da de-ubiquitinação de proteínas do NER, em especial do TC-NER e sua manutenção via proteassoma após tratamento com UV ainda não são conhecidas em tripanossomatídeos. Desse modo, apresentaremos nesse trabalho os estudos sobre as possíveis funções de TcUSP7 que coopera para controlar a estabilidade de CSB e RNA pol II a fim de assegurar o TC-NER e uma retomada eficiente da transcrição após UV em *T. cruzi*.

De forma geral, nesse trabalho nós buscamos entender qual é o papel da transcrição colapsada por danos gerados por UV e como decorre a sinalização para a morte após o bloqueio desse processo. Para tanto, estudamos genes relacionados com o reparo acoplado à transcrição, como CSB, e genes relacionados com o metabolismo dos ácidos nucleicos como: RPA, RNaseH1 e RNaseH2A os quais influenciam a via de resposta a danos ao DNA após UV. Nesse contexto, verificamos que possivelmente a sinalização para a morte após danos genotóxicos é dependente do processo de transcrição ativa em etapa de inicialização da síntese do mRNA, correlacionada com a presença de *R-loops* originários da estrutura colapsada onde se encontra a fita de RNA recém-sintetizada pareada com a fita de DNA molde. Desse modo, a formação dessa

estrutura híbrida durante o processo de transcrição acometido de dano e parada da RNA polimerase frente à lesão é o sinal para morte celular em *T. cruzi*.

Também descrevemos a importância dos níveis de TcCSB na célula, assim como, verificamos que TcCSB atua além do reparo acoplado a transcrição, uma vez que, os nossos resultados da cinética de CSB em *T. cruzi*, após UV, sugerem que essa proteína pode auxiliar na resolução de mRNAs dicistrônicos vindouros de danos causados durante a produção do transcrito que se acumulam e migram em grânulos do núcleo ao citoplasma.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Caracterizar os mecanismos moleculares da via de sinalização à resposta a danos ao DNA para o reparo acoplado a transcrição em *Trypanosoma cruzi*.

- a) Avaliar o papel de TcCSB para o TC-NER na sinalização para morte em *T. cruzi* após danos genotóxicos.
- b) Avaliar o papel da transcrição ativa na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico em *T. cruzi*.
- c) Descrever a influência das fases do ciclo celular na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico em *T. cruzi*.
- d) Avaliar o papel de TcRPA na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico em *T. cruzi*.
- e) Descrever o fenótipo da linhagem superexpressora do gene da TcRNAseH1 em resposta ao estresse genotóxico induzido por UV.
- f) Descrever o fenótipo da linhagem superexpressora do gene da TcRNAseH2A em resposta ao estresse genotóxico induzido por UV.
- g) Avaliar a influência da inibição do sistema ubiquitina-proteassoma na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico em *T. cruzi*.
- h) Estudar a localização celular da proteína TcCSB após tratamento com UV em *T. cruzi*.
- i) Descrever a cinética da proteína TcCSB em análise de curso de tempo após tratamento com UV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o estudo do gene TcCSB foram utilizados parasitos epimastigotas da cepa selvagem CL-Brener de *Trypanosoma cruzi* e as linhagens superexpressora e heminocaute para o gene CSB obtidas em nosso laboratório (MENDES, I. 2015). Para o estudo do gene TcRPA, foram utilizados parasitos epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e as linhagens superexpressora e heminocaute para o gene RPA que foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias - Instituto Butantan, SP. As células das linhagens de estudo mencionadas foram mantidas a 28°C em meio LIT (liver infusion-tryptose: 5g.L-1, NaCl 4g.L-1, bacto-tryptose 5g.L-1, KCl 0,4g.L-1, NaH₂PO₄ 8g.L-1, dextrose 2g.L-1, hemin 0,2% 10ml em NaOH 0,05M) pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 200.000 u/L de penicilina e 0,2g/L de sulfato de estreptomicina) e com o antibiótico específico para as linhagens de estudo na concentração final de 200 ug/mL de G418 ou Higromicina (Geneticin – Gibco).

Para a clonagem dos genes TcRNAseH1 e TcRNAseH2A foi utilizada a linhagem DH5 α de *Escherichia coli* termocompetentes cultivadas em meio LB líquido (Tryptona 10,0. Extrato de Levedura 5,0. Cloreto de Sódio 5,0.; pH Final: 7,2) com 10 μ L de ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C e para o estoque das culturas a -80°C, mediante acréscimo de 25% de glicerol. Para a transfecção foram utilizadas formas epimastigotas selvagens da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Essas foram cultivadas em meio LIT pH 7,4 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) e com a dição do antibiótico específico para as linhagens de estudo na concentração final de 200 ug/mL de G418.

3.2 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA NA PRESENÇA DE AGENTES GENOTÓXICOS

Culturas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram submetidas ao tratamento com inibidores e/ou agentes genotóxico, conforme descritos anteriormente. A taxa sobrevivência das culturas foi determinada através da contagem de células vivas em câmara citométrica, na presença do corante vital eritrosina (0,4% em PBS). A

porcentagem de sobrevivência foi calculada comparando a densidade celular das culturas tratadas com a densidade das culturas controle não tratadas crescidas sob as mesmas condições. Para cada tratamento, foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

3.3 CURVAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DE AGENTES GENOTÓXICOS

O crescimento das linhagens em estudo foi acompanhado em células controle e células tratadas com agentes genotóxicos e/ou inibidores. Culturas contendo inicialmente 2×10^7 células/mL foram incubadas a 28°C em meio LIT e contadas nos tempos determinados à cada pré-tratamento. Os ensaios foram feitos em placas de 24 poços, em triplicatas, e cada poço continha inicialmente 1ml de cultura. Para contagem do número de parasitos, esses eram diluídos em PBS (0,15 M pH 7,2) e eritrosina (0,4% em PBS), e posteriormente os parasitos vivos eram contados em câmara citométrica. Para cada tratamento, foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

3.4 TRATAMENTOS COM RADIAÇÃO UV

A fim de investigar o fenótipo das linhagens de *T. cruzi* selvagem, superexpressora e heminocaute dos genes em estudo frente ao estresse transcricional gerado por UV, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram colocadas em uma placa de Petri e expostas à luz ultravioleta, no Stratalinker® Crosslinker UV (Stratagene), sob a dose de 500 e 1.500 J/m². Depois de irradiadas (tratamento), as células eram contadas logo após (5') e nos tempos determinados para cada pré-tratamento. Os experimentos eram realizados em placas de 24 poços e as células eram mantidas a 28°C durante o período do experimento. Para cada tratamento, foram realizados pelo menos três experimentos independentes, todos em triplicata.

3.5 TRATAMENTO COM INIBIDOR DA RNA POLIMERASE

Para investigar o fenótipo das linhagens de *T. cruzi* estudadas quando expostas a UV sob o efeito da inibição da atividade transcricional, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento das culturas selvagem e TcCSB +/- foram pré-tratadas com

α -amanitina (Fórmula empírica: $C_{39}H_{54}N_{10}O_{14}S$) um inibidor seletivo da RNA polimerase II e III (A2263, Sigma-Aldrich, USA), na concentração de 60 ug/ml por 15 min, conforme descrito por DOSSIN, F. & SCHENKMAN, S., 2005. Desse modo, as linhagens estudadas foram pré-incubadas na presença e ausência de α -amanitina e posteriormente ao tratamento às células (2×10^7 /ml) foram lavadas com PBS 1X estéril, duas vezes e o *pellet* ressuspensionado em meio LIT, em seguida as células foram desafiadas com radiação UVC 1.500 J/cm^2 e sua sobrevivência determinada e o crescimento acompanhado.

3.6 TRATAMENTO COM RADIAÇÃO GAMA E INDUÇÃO DA INIBIÇÃO DA TRANSCRIÇÃO.

Nosso grupo demonstrou que em *T. cruzi* a transcrição é inibida pela exposição à radiação ionizante (500Gy) durante o estágio não replicativo das células que se mantêm quiescentes até 96 horas após exposição (CHAME, D. F., 2018.; PASSOS-SILVA, D. G. 2010. Como descrito por CHAME, D. F. em 2018, as células expostas à irradiação gama após 24 horas apresentaram maior coloração para RNAs recém-sintetizados (*Click-iT™ RNA Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit*), indicando que o nível de transcrição não foi afetado pela radiação ionizante. No entanto, após 48 horas, os níveis de novos transcritos são baixos e não detectados. Assim, considerando essa informação células foram desafiadas com UVC horas após a exposição a irradiação gama a fim de verificar sua taxa de sobrevivência nos tempos 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120 e 144 horas. Para isso utilizamos formas epimastigotas em fase de crescimento exponencial de culturas selvagens (2×10^7) da cepa CL Brener pré-tratadas com 500 Gy e os controles (não irradiados) foram desafiados com UV (1.500 J/cm^2) nos tempos 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120 e 144h após radiação gama e sua sobrevivência à UVC foi determinada e o crescimento acompanhado.

3.7 SINCRONIZAÇÕES DE CÉLULAS EM FASE G1 DO CICLO CELULAR

Para investigar a influência das fases do ciclo celular em resposta à exposição à radiação UVC, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento da linhagem selvagem (CL Brener), foram pré-tratadas com hidroxiuréia (HU), (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 20 mM por 24 horas como descrito por UMAKI, A. C. em

2013. A hidroxiuréia (HU) inibe a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, responsável por converter ribonucleosídeos-difosfato em precursores de desoxirribonucleotídeos, desse modo à síntese de DNA é inibida levando à sincronização das células em G1 (WRIGHT et al., 1990). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X estéril para remover a HU e o *pellet* ressuspenso em meio LIT. As amostras de células sincronizadas foram recolhidas em intervalos de tempo de 5', 3, 6, e 20 horas, momento correspondente às fases do ciclo celular: início de S (3h); S (6h) e G2 (20h), respectivamente, conforme descrito por (MENDES, I. 2015), para análises através de FACS e para o desafio com radiação UVC 1.500 J/cm² e sua sobrevivência determinada.

3.8 ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR POR FACS

A progressão do ciclo celular foi avaliada a partir da sincronização das células com hidroxiuréia (Sigma Aldrich) na fase G1, para isso as células foram submetidas à análise por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Amostras foram recolhidas em intervalos de tempo de 5', 3h, 6h, e 20h, lavadas PBS 1X e fixadas em etanol 70% por 16 horas. Após esse período, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e o *pellet* ressuspenso em PBS 1X contendo 10 µg/mL de RNase A (Invitrogen) e 10 µg/mL de iodeto de propídeo para marcação do conteúdo de DNA. As amostras foram incubadas nessa solução por 30 minutos, 37°C, protegidas da luz. As amostras foram lidas no aparelho FACSCan (Benckton-Dickson) e os resultados analisados em forma de histograma no programa *FlowJo v10*.

3.9 OBTENÇÃO DE LINHAGENS SUPEREXPRESSORA DO GENE RNASEH1 E RNASEH2A DE *T. cruzi*.

3.9.1 Identificação das sequências gênicas e proteicas homólogas de hRNaseH1 e hRNaseH2A em *T. cruzi*.

A partir das sequências de aminoácidos da RNaseH1 humana (código de acesso O60930-1) e RNaseH2A humana (código de acesso O75792-1) disponíveis na base de dados de proteínas *Uniprot* foi realizada uma pesquisa no banco de dados de sequências genômicas e proteicas preditas de tripanossomatídeos (*Trypanodb*), utilizando o

algoritmo de bioinformática *BLASTp* (do inglês, *Protein Basic Local Alignment Search Tool*), (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Apesar da proteína RNaseH2 eucariótica ser heterotrimérica, optou-se por superexpressar apenas a sequência gênica da subunidade catalítica A (RNaseH2A), tendo em vista que esta que é responsável pela atividade enzimática de dissolução dos híbridos DNA/RNA. O parâmetro de *e-value* utilizados para alinhamentos foi menor ou igual a 1×10^{-6} . O resultado da busca permitiu identificar sequências de aminoácidos de proteínas hipotéticas conservadas que apresentam identidade e similaridade de sequência com hRNaseH1 e hRNaseH2A. As sequências de aminoácidos de proteínas hipotéticas à hRNaseH1 e hRNaseH2A que foram preditas em *T. cruzi* para a cepa CI Brener (*Esmeraldo-Like* e *Non-Esmeraldo-Like*), estão descritas na tabela 3.

3.9.2 Predição de domínios proteicos conservados nas sequências hipotéticas das TcRNaseH1 e TcRNaseH2A encontradas em *T. cruzi*.

Para identificar os domínios conservados nas sequências proteicas das supostas RNaseH1 e RNaseH2A de *T. cruzi*, foram utilizados a base de dados de famílias de proteínas *Pfam* (disponível em <https://pfam.xfam.org/>), (FINN *et al.*, 2016) e *Position Specific Iterated- BLAST (PSI-BLAST)*, (ALTSCHUL *et al.*, 1990), considerando significativos os valores de $E < 10^{-7}$.

3.9.3 Amplificação das sequências gênicas homólogas RNaseH1 e RNaseH2A de *T. cruzi*.

3.9.3.1 Iniciadores:

Após a identificação das sequências gênicas das supostas RNaseH1 e RNaseH2A de *T. cruzi*, foram desenhados iniciadores (*primers*) para a amplificação específica da ORF (Janela Aberta de Leitura - *Open Reading Frame*) dos respectivos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

	Iniciador	Sequência
1	Xba1_F_RNaseH1_ORF	5´ AAATCTAGAAATGATGTCGTCATCGTCAAG
2	Xho1_R_RNaseH1_Stop	5´ AAACTCGAGTTACTTGTTCATCTGCGG
3	Xba1_F_RNaseH2A_ORF	5´ AAATCTAGAAATGGCAGAGCCACGTT
4	Xho1_R_RNaseH2A_Stop	5´ AAACTCGAGTTACCCAGAGACGGATG

Tabela 1: Primers e suas sequências correspondentes para amplificação dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A. Os sítios de corte das enzimas de restrição estão sublinhados. Os primers 1 e 2 foram utilizados para a subclonagem do gene TcRNaseH1. Os primers 3 e 4 foram utilizados para a subclonagem do gene TcRNaseH2A.

3.9.3.2 Extração de DNA genômico:

A extração de DNA genômico da Cepa CL Brener de *T. cruzi* para a amplificação dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A foi baseada no protocolo adaptado de extração de DNA com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e solução de lise de Madisen. Este método tem quatro etapas: lise celular, extração do DNA, isolamento do DNA por precipitação e purificação do DNA. Na primeira etapa, foram adicionados 300 µL de solução de lise de Madisen (Tris-HCl 20mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0; SDS 0,5%; NaCl 10 mM) previamente aquecida a 55°C em 1×10^8 células epimastigotas de *T. cruzi*. Em seguida, foram adicionados 10µL de Proteinase K (20mg/mL) e o conteúdo foi homogeneizado rapidamente no *vórtex* e incubado a 55°C por 5 minutos. Na segunda etapa, foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1 ao lisado, e o conteúdo foi agitado por 10 segundos por inversão lenta e centrifugado a 1.3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o restante do centrifugado foi descartado. Em seguida, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcoolisoamílico (proporção 24:1) ao sobrenadante e a mistura foi agitada novamente por 10 segundos por inversão lenta e centrifugada a 1.3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

Na terceira etapa, para o isolamento do DNA genômico, foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 7,5M e 1 volume de isopropanol 95-100% gelado, e o conteúdo foi incubado *overnight* no freezer. Em seguida, foi centrifugado a 1.3000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Na última etapa, foram

adicionados 100 μL de etanol 70% ao *pellet*, para a remoção de sais e pequenas moléculas inorgânicas. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1.2000g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado vertendo cuidadosamente o microtubo. Os dois passos anteriores foram repetidos, e o *pellet* foi deixado em temperatura ambiente para evaporação do etanol. Por fim, o DNA purificado foi ressuspenso em 50 μL de água mili-Q autoclavada e a concentração foi estimada utilizando o espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop*.

3.9.3.3 Amplificação dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A por reação de PCR.

A partir do DNA genômico (100 ng/ μl) extraído das cepas CL Brener de *T. cruzi* a amplificação dos genes RNaseH1 e RNaseH2A foi realizada por PCR em um volume final de 20 μL . As reações foram preparadas no gelo e em microtubos, contendo água mili-Q autoclavada, *PCR Buffer 10X* (Promega) na concentração 1X, 1,5mM de MgCl_2 (Promega), 0,2mM de cada dNTPs (Promega), 0,5 μM dos *primers forward* e *reverse*, ~100 ng de DNA genômico e (~5 U) de *Taq DNA Polymerase* (Promega). Em seguida a reação foi incubada em termociclador, programa de termociclagem está disponível na tabela 2. Após o término da reação, o produto da PCR de cada microtubo foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) feito em TAE (Tris-Acetato-EDTA) 0,5X e corado com brometo de etídio para a visualização dos fragmentos gênicos amplificados. A separação dos fragmentos foi feita a 90V por cerca de 50 minutos. A banda de DNA amplificado foi visualizada em fotodocumentador BioRad, para cada um dos respectivos genes em estudo, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A.

Etapas		Temperatura		Tempo
Desnaturação inicial		95°C		10 min
Ciclos da PCR (30 vezes)	Desnaturação	95°C		30 s
	Anelamento	54°C (H1)	55°C (H2A)	50 s
	Extensão	72°C		60 s
Extensão final		72°C		5 min

Tabela 2 – Programa de termociclagem para a amplificação dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A por PCR. As temperaturas da etapa de anelamento para os iniciadores do gene TcRNaseH1. A célula colorida em amarelo contém as temperaturas da etapa de anelamento para os primers do gene TcRNaseH2A.

3.9.4 Clonagem dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A no vetor de manutenção *pGEM-T-Easy*.

Os fragmentos amplificados correspondentes aos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A foram purificados do gel de agarose 1% utilizando kit de purificação de DNA em banda em gel de agarose *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, (GE Healthcare, Estados Unidos). Em seguida, os fragmentos purificados foram clonados, inicialmente, no vetor *pGEM-T Easy Systems* (Promega), segundo recomendações do fabricante. Após a transformação bacteriana (descrita no item seguinte) os clones positivos *pGEM-T Easy Systems+TcRH1* e *pGEM-T Easy Systems+TcRH2A* foram selecionados através de PCR de colônia, técnica que consiste em testar a presença do inserto clonado ao utilizar um pequeno inóculo da colônia de bactérias como molde (DNA) de reação de PCR. Os clones positivos para a PCR de colônia foram crescidos em 5 mL de meio líquido 2xYT (16g de bacto/triptona, 10g de extrato de levedura, 5g de NaCl e ddH₂O q.s.p. 1L) com 100µg/ml de ampicilina. Os plasmídeos contidos nos clones selecionados foram extraídos utilizando-se o kit de extração de DNA plasmidial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Os vetores de clonagem contendo os insertos foram então digeridos com as enzimas específicas e os fragmentos liberados foram purificados a partir do gel de agarose 1%, utilizando o kit de purificação *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a confirmação de que o DNA plasmidial extraído contém os genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, foi realizada uma reação de digestão enzimática usando as enzimas de restrição cujos sítios de clivagem foram adicionados às sequências gênicas a partir da PCR. Os plasmídeos *pGEM-T Easy Systems+TcRH1* e *pGEM-T Easy Systems+TcRH2A* cujos insertos seriam usados para a subclonagem no vetor *pROCKNeo*, a reação de digestão foi feita inicialmente em um volume final de 40 µL usando 1µL da enzima de restrição *XhoI* (Promega) (10u/µL). Após 2 horas de digestão foi adicionado mais 1 µL da enzima *XhoI*, deixando a reação a *overnight*. Foi coletada uma alíquota de 5 µL (alíquota 1) dessa reação inicial e o volume da mesma foi dobrado para 80 µL, adicionando-se 1 µL da enzima de restrição *XbaI* (Promega) (10u/µL) e, após 2 horas, mais 1 µL desta enzima foi adicionado, deixando a reação a *overnight*. Após este período, foi coletada uma alíquota de 5 µL (alíquota 2) desta reação. As duas

alíquotas de 5 µL foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). As digestões enzimáticas foram feitas usando água mili-Q autoclavada, *Restriction Enzyme 10X Buffer D* na concentração 1X, 0,1 µg/µL de *Acetylated BSA* (10µg/µL), 1µL de cada enzima (10u/µL) e ~1 µg de cada DNA plasmidial. As reações foram preparadas no gelo e incubadas a 37°C na estufa.

3.9.5 Subclonagem dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A ao vetor de superexpressão pROCK-Neo.

Para a subclonagem dos insertos do gene TcRNaseH1 e TcRNaseH2A no vetor *pROCK-Neo*, este plasmídeo foi submetido a uma digestão enzimática semelhante à citada no subitem anterior, usando 1 µL das enzimas *Xba I* (Promega; 10u/µL) e *Xho I* (Promega; 10u/µL). A confirmação da digestão foi por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), para a visualização do plasmídeo linear. A reação de ligação dos insertos TcRNaseH1 e TcRNaseH2A no vetor *pROCK-Neo* foi feita usando diretamente o inserto proveniente da digestão dos plasmídeos *pGEM-T Easy Systems+TcRH1* e *pGEM-T Easy Systems+TcRH2A* e vetor *pROCK-Neo* digerido, na razão molar inserto:vetor plasmidial 3:1. A ligação foi feita em um volume final de 10 µL, usando os mesmos reagentes e procedimentos da reação de ligação para o vetor *pGEM-T Easy Systems*. O produto da ligação foi usado para transformação de linhagens DH5α de *Escherichia coli*, conforme descrito no item seguinte. A extração do plasmídeo foi feita usando-se o kit de extração de DNA plasmidial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). A confirmação da subclonagem dos insertos TcRNaseH1 e TcRNaseH2A no vetor *pROCKNeo* foi feita por PCR de colônias e digestão do plasmídeo para liberação dos insertos. Após tais etapas, os plasmídeos extraídos foram enviados para a empresa *Myleus*, a qual foi responsável pelo sequenciamento dos mesmos com base no método de Sanger. As sequências de nucleotídeos geradas foram analisadas pelo *software Genetic Analyser Sequencer* (AppliedBiosystems), para a obtenção da sequência *contig* gerada para cada gene em estudo TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, respectivamente.

3.9.6 Transformação bacteriana

Bactérias *E. coli* linhagem DH5 α foram tornadas eletrocompetentes da seguinte forma: cerca de 1 L de cultura com OD600 igual a 0,5 foi centrifugada a 700 x g por 10 minutos e lavada 3 vezes com 200 mL de glicerol 10%. Em seguida foi feita uma segunda lavagem com 50 mL de glicerol 20%. As células foram solubilizadas em 1 mL de glicerol 10% de forma que a diluição 1/10 apresentasse OD600 igual a 0,15. Foram feitas alíquotas de 40 μ L de cultura, as quais foram estocadas a -80°C. Cada transformação foi realizada incubando a alíquota com o plasmídeo de interesse, por 5 minutos em gelo. Em seguida, a alíquota foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad) e eletroporada a 2,5 kV, em um eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 700 μ L de meio 2xYT, transferindo todo o volume para tubos de 1,5 mL. Após 1 hora de incubação a 37°C, a cultura foi plaqueada em meio sólido 2xYT ágar contendo 100 mg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C. Após a incubação, os clones positivos foram identificados por PCR de colônia esses foram propagados e armazenados em meio 2xYT mais glicerol 50% e congeladas a -80°C.

3.9.7 Transfecção e seleção de epimastigotas de *T. cruzi*.

A transfecção dos plasmídeos foi realizada por eletroporação, de acordo com protocolo descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Células de *T. cruzi* na forma epimastigota da cepa CL Brener foram cultivadas em meio de cultura LIT (do inglês, *Liver Infusion-Tryptose*: 5g.L⁻¹, NaCl 4g.L⁻¹, bactotriptose 5g.L⁻¹, KCl 0,4g.L⁻¹, NaH₂PO₄ 8g.L⁻¹, dextrose 2g.L⁻¹, hemina 0,2% 10ml em NaOH 0,05M) contendo 10% de soro fetal bovino e de penicilina/estreptomicina (200 μ g/mL). Para a transfecção, 2x10⁷ células em cultura foram centrifugadas a 3.000 rpm, lavada em PBS 1X e ressuspendidas em tampão de eletroporação 1x TBS (50mM de KCl, 1,5 mM CaCl₂, 900mM NaHPO₄, 500 mM de HEPES) q.s.p. 100 μ L na presença de cada plasmídeo *pROCKNeo+TcRNAseH1* e *pROCKNeo+TcRNAseH2A*, respectivamente. As células controle (MOCK) receberam água ao invés dos plasmídeos para a transfecção. Foi utilizando o programa U-33 do eletroporador *Amxa Nucleofector*. Em seguida, os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT e incubados a 28°C. Um dia após a eletroporação, foram adicionados 200

µg/mL do antibiótico de seleção neomicina (*Invitrogen*). Para a seleção de clones resistentes os parasitos transfectados com os plasmídeos *pROCKNeo+TcRNaseH1* e *pROCKNeo+TcRNaseH2A* foram mantidos em garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio LIT e 200 µg/mL de neomicina. Tais culturas de células foram incubadas a 28°C e mantidas com repiques semanais a fim de selecionar os clones resistentes contendo plasmídeo de superexpressão *pROCKNeo* para cada um dos genes em estudo, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, respectivamente. Após a seleção dessas linhagens resistentes a neomicina prosseguimos com os estudos e caracterização dos fenótipos celulares após tratamento com agente genotóxico nas linhagens superexpressora do gene TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, respectivamente.

3.10 AVALIAÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA SINALIZAÇÃO DE MORTE APÓS O TRATAMENTO COM AGENTE GENOTÓXICO EM *T. cruzi*.

3.10.1 Identificação da sequência gênica e proteica homóloga de hUSP7 em *T. cruzi*.

A partir da sequência da proteína hUsp7 humana (número de acesso EAW85194.1) utilizamos da ferramenta de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de Altschul et al., (1990), para realizar uma pesquisa nos bancos de dados de sequências genômicas e de sequências proteicas preditas de *Trypanosoma cruzi* no bando de dados Trytrypdb (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) utilizando o algoritmo BLASTp. O resultado da busca permitiu identificar sequências de aminoácidos de proteínas hipotéticas conservadas que apresentam identidade e similaridade de sequência com hUsp7. Tabela 8.

3.10.2 Predição de domínios proteicos conservados nas sequências hipotéticas da suposta TcUSP7 encontrada em *T. cruzi*.

Para identificar os domínios conservados nas sequências proteicas da suposta TcUSP7 de *T. cruzi*, foi utilizado a base de dados de famílias de proteínas *Pfam* (disponível em <https://pfam.xfam.org/>), (FINN et al., 2016) e *Position Specific Iterated-*

BLAST (PSI-BLAST), (ALTSCHUL et al., 1990), considerando significativos os valores de $E < 10^{-7}$.

3.10.3 Tratamento com inibidores da via ubiquitina-proteassoma.

Para descrever o fenótipo das linhagens de *T. cruzi* estudadas sob o efeito da inibição da atividade proteassomal, quando expostas a UVC, epimastigotas em fase exponencial de crescimento das culturas selvagem e TcCSB +/- foram pré-tratadas com MG132 (Fórmula empírica: $C_{26}H_{41}N_3O_5$ - [Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal] - SML1135, Sigma-Aldrich, USA. Um potente inibidor do proteassoma permeável à membrana e reversível, na concentração de 50uM por 30 min, como descrito por CARDOSO J, L., et al., 2011, após o tratamento às células (2×10^7 /ml) foram lavadas com PBS 1X estéril, duas vezes e o *pellet* ressuspensionado em meio LIT, em seguida as células foram desafiadas com radiação UVC 1.500 J/cm^2 e sua sobrevivência determinada e o crescimento acompanhado.

Para descrever o fenótipo das linhagens de *T. cruzi* estudadas sob o efeito da inibição da deubiquitinação, quando expostas a UVC, as culturas nas formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram pré-tratadas com PR-619 – (Fórmula empírica: $C_7H_5N_5S_2$ [2,6-diaminopyridine-3,5-bis(thiocyanate)]) - SML0430, Sigma-Aldrich, USA. Um inibidor reversível de deubiquitinases (DUBs), permeável às células que induz o acúmulo de proteínas poliubiquitinadas, sem afetar diretamente a atividade do proteassoma, na concentração de 20 uM por 30 min, conforme ALTUN, M., et al. 2011 e TIAN, X., et al. 2011. Após o tratamento às células (2×10^7 /ml) foram lavadas com PBS 1X estéril, duas vezes e o *pellet* ressuspensionado em meio LIT, em seguida as células foram desafiadas com radiação UVC 1.500 J/cm^2 e sua sobrevivência determinada e o crescimento acompanhado.

3.11 OBTENÇÃO DO ANTICORPO: ANTI-TcCSB

3.11.1 Expressão heteróloga da proteína recombinante TcCSB.

Para a expressão heteróloga a sequência de nucleotídeos codificando para o domínio catalítico de TcCSB foi amplificada por PCR, utilizando iniciadores (*Forward* 5'-GCTAGCATTTATAACCGCCTACTGGAC-3'- sítio de clonagem [NheI]; *Reverse*: 5'-GAATTCCTAATACACACCGA-3'- sítio de clonagem [EcoRI] desenhados baseando-se nas sequências disponibilizadas em banco de dados (tritypdb.org) e clonadas em vetor pET28-a modificado para conter um sítio de clivagem da cauda de histidina pela protease TEV. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia ou digestão com enzimas de restrição, conforme descrito em relatório por Dra. Karla de Andrade Oliveira. A expressão heteróloga de parte da proteína TcCSB (61kDa) foi obtida na cepa BL21 pRARE+TcCSB de *E. coli*, o inserto foi confirmado por sequenciamento utilizando os primers T7 promotor + T7 terminator e pela análise da fase de leitura com os softwares ExPASy e *Open Reading Frame Finder*. A condição de temperatura para a indução foi determinada em 30°C por 16h e a concentração de IPTG em 0,5 contendo os antibióticos de seleção.

O *pellet* da cultura, obtido por centrifugação a 2500 g, por 20 minutos a 4°C, foi lisado no gelo em tampão Tris 50 mM contendo 1% p.v sacarose 1% v.v glicerol e 1 *tween* 20 em pH 7,4 adicionado de 200mM de PMSF, esse foi socinado em 3 pulsos de 10s com intervalos de 10s entre pulsos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada e coletamos as frações solúvel e insolúvel. Em seguida, realizamos a análise de espectrometria de massa para confirmação da expressão heteróloga de parte da proteína TcCSB permitindo assim o uso da mesma para a etapa imunização e obtenção do soro.

3.11.2 SDS/PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada para verificar a expressão heteróloga de parte da proteína TcCSB permitindo a visualização da banda de interesse (TcCSB ~61kDa) induzida por IPTG. Para isto, tampão desnaturante 2X foi adicionado a 20 µg de cada amostra na proporção 1:1 (v/v), havendo posterior incubação em banho-maria a 100 °C por dez minutos para desnaturação das proteínas.

Em seguida, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 15% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED) com gel de concentração stack a 4% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris 1,0 M pH 6,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED). A eletroforese teve duração aproximada de 2h30min, ocorrendo sob 70 V nos primeiros 15 minutos e 100 V no tempo restante. Finalizada a eletroforese, os géis foram colocados em solução de coloração rápida de Coomassie R-250 a 0,25% por uma hora e após este tempo foram transferidos para solução descorante contendo ácido acético a 5% e metanol a 10%, onde permaneceram *overnight* para visualização das bandas. Os géis foram fotografados utilizando o fotodocumentador Gel Doc EZ Imager, BioRad.

Após a confirmação da presença da banda de interesse induzida por IPTG, realizamos a análise de espectrometria de massa da mesma a fim de confirmar que a expressão heteróloga confere-se a parte da proteína TcCSB permitindo assim o uso da mesma para a etapa imunização.

3.11.3 Preparação de amostra para espectrometria de massa.

A fração de membrana de três replicatas biológicas independentes foram recortadas do gel SDS/PAGE para a banda de interesse (TcCSB) e os controles positivo (albumina) e negativo (porção do gel SDS/PAGE sem amostra), essas foram submetidas a lavagens com 200ul de 25mM de NH_4HCO_3 /50% de ACN (Acetonitrila) pH8 para a remoção do corante. Em seguida, essas amostras foram tratadas com DTT 10 mM em 25 mM de NH_4HCO_3 para à redução das pontes dissulfeto por 1 hora a 56°C. Logo após, os grupos tióis localizados nas cadeias laterais dos resíduos de cisteína foram alquilados com iodoacetamida (IAA) 55 mM (concentração final) por 1h, no escuro, a TA, após essa etapa, lavadas 3X com 25mM de NH_4HCO_3 /50% de ACN. A digestão enzimática foi realizada com Tripsina (1:100) (Promega, Madison) o suficiente para cobrir o gel, após 10min no gelo adicionamos 20ul de TEAB 50 mM, pH 8, a digestão trípica ocorreu por 16 horas a 37 °C. Os extratos foram passados em colunas ZipTip®C18 (Millipore, USA) para dessalinização e concentração dos peptídeos para análise por espectrometria de massa.

3.11.4 Espectrometria de Massa: MALDI-TOF/TOF.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Proteômica, parte do Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para a análise das triplicatas em estudo 0,5 µL da amostra concentrada foi misturada com 0,25 mL de uma solução saturada de matriz [10 mg/mL α -ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI), em 50% acetonitrila/0.1% de ácido trifluoroacético]. As amostras foram aplicadas na placa MTP AnchorChip™ 600/384 (Bruker Daltonics) e deixadas secando em temperatura ambiente. Os dados brutos para a identificação das proteínas foram obtidos no MALDI-TOF/TOF Autoflex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) com o instrumento no modo positivo/refletor controlado pelo software FlexControl™3.3. A calibração do instrumento foi realizada através da utilização de peptídeos de calibração (Peptide Standard, Bruker Daltonics) como referência. Picos de contaminação de tripsina foram excluídos da lista utilizada na pesquisa em banco de dados. Cada espectro foi produzido pela acumulação de dados a partir de 200 disparos consecutivos do laser. Os dados obtidos foram armazenados e levados para o software Bruker Daltonics BioTools 3.3™, onde foi realizada a pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix Science, USA – <http://www.matrixscience.com>). Apenas proteínas com valores de score $P \leq 0,05$ foram consideradas na identificação.

3.11.5 Imunização e obtenção do soro anti-TcCSB.

Para obtenção de soro anti-TcCSB, foi utilizado a proteína TcCSB recortada do gel SDS/PAGE e macerada em nitrogênio líquido de modo a liquefazer esse *pool* proteico (TcCSB) permitindo a aplicação nos animais. Foram utilizados cinco camundongos *swiss* que foram imunizados com 50ul *pool* proteico (TcCSB) + 50ul de adjuvante completo de Freund para a primeira imunização. Em seguida, realizamos cinco etapas de imunização a cada 15 dias utilizando 50ul *pool* proteico (TcCSB) + 50ul de adjuvante incompleto de Freund. Quinze dias após a última imunização, foi realizada a punção cardíaca para retirada do sangue, o mesmo foi centrifugado e o soro foi armazenado no freezer -20°C, para posterior utilização. A presença de anticorpos contra a proteína TcCSB nos soros dos animais imunizados foi verificada por *Western Blot*.

3.12 WESTERN BLOT

Após a obtenção do soro anti-TcCSB utilizamos a técnica de Western Blot para a validação da reatividade contra a proteína TcCSB no extrato total de *T. cruzi* e para a determinação dos níveis de TcCSB nas células estudadas. Para a obtenção do extrato total de proteínas das linhagens estudadas foram coletadas 1×10^8 células de cada cultura na fase exponencial, lavadas duas vezes com PBS1X e após ressuspensas em 50 μ l de solução PBS1X + PMSF *Proteinase Inhibitor* (Thermo Scientific) e mantidas no gelo por 20min, em seguida adicionou-se 50 μ l do tampão de amostra 2x (100 mM Tris-HCL pH 6,8, 4% SDS, 0,2% Azul bromofenol, 20% glicerol, 200 mM DTT). As suspensões foram sonicadas (Fisher Scientific™ Model 505 Sonic Dismembrator) a 30% da amplitude máxima por 5 ciclos de 20 segundos, com um intervalo de 20 segundos entre cada ciclo. Os extratos foram fervidos 10 minutos e a concentração proteica foi determinada usando o kit de dosagem BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Todos os extratos foram estocados a -80 °C. Para a separação das proteínas em gel utilizamos o protocolo de eletroforese SDS-PAGE conforme descrito no item anterior.

Após a separação das proteínas no gel realizamos a etapa de *blotting*, para isso o gel foi incubado durante 10 minutos no tampão de transferência (30 mM Glicina, 48 mM Tris, 0,05% SDS, 20% metanol) e a membrana de PVDF lavada com metanol e em seguida água milli-Q. Foi utilizado um sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), durante 50 minutos a 300mA, seguindo as instruções de montagem do fabricante. A membrana foi brevemente corada com uma solução de Ponceau S (0,2% Ponceau S, 5% ácido acético glacial) para verificar a qualidade da transferência e em seguida descorada com três lavagens em água milli-Q. Posteriormente, foi realizada a incubação em uma solução de bloqueio contendo o tampão TBST (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM cloreto de sódio, 0,1% Tween 20) e 5% de BSA, *overnight* a 4°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos em TBST e incubada com uma solução do anticorpo primário anti-TcCSB (diluição 1/5.000 e 3% BSA) por 3 horas, em seguida foram realizadas 3 lavagens com TBST e a incubação com o anticorpo secundário IgG anti-mouse HRP-conjugado (Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab), diluído 1/10.000 em TBST e 3% de BSA, durante 1 hora. Após a incubação, foram realizadas três lavagens em TBST e a membrana foi revelada usando o sistema Immobilon Western Chemiluminescent HRP

Substrate (Merck-Millipore) e o sistema de imagem Kodak gel logic 1500. Como controle de carregamento assim como para a quantificação relativa dos níveis proteicos de TcCSB nas linhagens estudadas foi utilizado como controle o anticorpo anti- α -tubulina. Após a marcação com anti-TcCSB a membrana foi estripada em água fervente por 10 min bloqueada *overnight* e incubada com o anticorpo primário anti- α -tubulina (diluição 1/10.000) sob agitação por 3 horas. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com tampão TBST por 5 minutos e incubada com os anticorpos secundários, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Immuno Chemicals) na diluição 1:5000 por 1 hora. A membrana foi revelada usando o sistema Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck-Millipore) e o sistema de imagem Kodak gel logic 1500. O nível de proteína em extrato total foi calculado e normalizado a partir do nível do controle de carregamento α -tubulina utilizando o software Image J.

3.13 IMUNOLocalização DA PROTEÍNA TcCSB POR IMUNOFLOUORESCÊNCIA.

Com o objetivo de descrever a localização celular da proteína TcCSB e sua cinética em análise de curso de tempo após tratamento com UV-C realizamos a técnica de imunofluorescência em linhagens controle e tratadas com 500 J/cm² e observamos a cinética nos tempos de 30', 2h, 4h e 24h após irradiadas. Para isso, 1x10⁷ células das culturas em fase exponencial do crescimento, controle e tratadas foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 500 μ L de paraformaldeído a 4% por 20min. Após a fixação estas foram lavadas novamente e ressuspensas em 0,5 mL de PBS. Em seguida, foram adicionados 20 μ L desta suspensão em cada poço em triplicata por amostra em lâminas de oito poços pré-tratadas com a solução de Poly-L-Lisina a 0,01% (Sigma, incubadas a temperatura ambiente por 1 hora), após 20min e aderência dos parasitos os poços foram lavados com PBS.

Em seguida, as amostras foram bloqueadas e permeabilizadas durante 30 minutos com uma solução contendo 5% BSA e 0,5% Triton X-100 em PBS. Após duas lavagens com PBS, as amostras foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-TcCSB diluído 1/1.000 com 2% BSA em PBS. As amostras foram em seguida lavadas três vezes com PBS e incubadas por 1 horas com o anticorpo secundário IgG anti-mouse Alexa Fluor® 488 (ab150113, Abcam) na diluição de 1/600

suplementada com 5% de soro normal de cabra em PBS (Thermo Fisher Scientific). O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com Hoechst 3342 diluído 1/1.000 em PBS (Thermo Fisher Scientific) por 20 minutos e após duas lavagens com PBS a lâmina foi selada utilizando o ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram adquiridas em parceria com a Dra. Luciana de Oliveira Andrade do Departamento de Morfologia e utilizamos o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Vert.A1, utilizando a objetiva de 100x.

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as curvas de crescimento de *T. cruzi*, utilizou-se teste *t* não pareado. Para os gráficos de sobrevivência utilizou-se o teste ANOVA para análise de variância. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., CA, USA). Os dados foram apresentados como a média +/- e desvio padrão (SD).

4. RESULTADOS

4.1 A TRANSCRIÇÃO ATIVA INFLUÊNCIA A RESPOSTA A DANOS NO DNA EM *Trypanosoma cruzi*.

Como descrito anteriormente, a célula integra os processos de reparo de DNA com a transcrição e apoptose em uma rede que é conhecida como a resposta de dano ao DNA (DDR). Em *T. cruzi*, o TC-NER tem revelado inúmeras evidências de sua participação efetiva para a sobrevivência desse parasito. Em nosso laboratório descrevemos que, após a exposição à radiação UVC, a subvia TC-NER está envolvida na resposta aos danos gerados por este agente, influenciando a sobrevivência imediata do parasito à exposição UVC, uma vez que o excesso de TcCSB na linhagem superexpressora, onde a expressão relativa da proteína CSB é 0,5 vezes maior em relação a linhagem selvagem, é capaz de direcionar as células para a morte após o tratamento com altas doses de UVC demonstrando que níveis adequados de TcCSB relaciona-se com o fenótipo de morte em resposta dose-dependente à UV como descrito por (MENDES, I. C. 2015). A DDR é desencadeada por proteínas-sensores que pertencem à família da proteína quinase incluindo ATM e ATR. No estudo da DDR para o TC-NER em *T. cruzi*, os dados do nosso grupo de pesquisa ressaltam o papel de ATM e ATR nesse parasito, uma vez que a sinalização para morte imediata em células expostas à UVC é dependente dessas cinases que quando inibidas não direcionam as células para a morte. Considerando essas relações descritas anteriormente, questionamos qual o papel da transcrição ativa nessa sinalização de morte imediata descrita após tratamento com UVC. Qual o desfecho da DDR para o TC-NER frente aos danos gerados por UVC na ausência do evento transcricional?

Com a finalidade de investigar o fenótipo após exposição a UVC das linhagens celulares selvagem e TcCSB heminocautas e superexpressoras sob o efeito da inibição da atividade transcricional, as células foram pré-tratadas com α -amanitina (A2263, Sigma-Aldrich, USA), em uma concentração que permitiu inibir seletivamente a atividade de RNA polimerase II, bloqueando assim a entrada da RNA Pol II no sítio de transcrição e consequentemente a inicialização da síntese de RNA. As células pré-tratadas e lavadas e controle (não tratado) foram desafiadas com radiação UVC 1.500 J/cm² e sua sobrevivência determinada e o crescimento acompanhado. O gráfico (figura 9)

demonstra que na ausência de transcrição, ou seja, em células selvagens tratadas com α -amanitina, essas são significativamente mais resistentes que as células selvagens não tratadas ($p < 0,0001$), fenótipo observado logo após a exposição à UVC, tempo 5' como mostra o gráfico de sobrevivência.

A

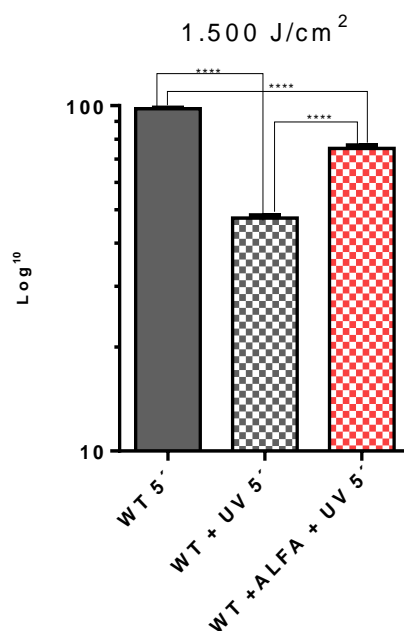


Figura 9 - Sobrevivência celular em células selvagem pré-tratadas com α -amanitina e expostas à UV. A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - barra cinza) e tratadas com 1.500 J/cm^2 (WT + UV - barra cinza quadriculada). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade da RNA polimerase II, as células foram pré-tratadas com alfa-amanitina (60ug - 15 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm^2 (WT+ALFA+UV - barra vermelho quadriculado). A sobrevivência foi determinada para as linhagens selvagem controle e desafiadas com UV e sob o efeito da inibição da transcrição. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivência em Log^{10} .

Outro fenômeno observado ao acompanhar o crescimento da célula selvagem pré-tratada com alfa-amanitina e desafiadas com UV, a retomada da transcrição tem efeito deletério, ao passar das horas, levando as células à morte, como observado na curva de crescimento nos tempos de 5', 1, 2, 4 e 6 horas após irradiação, figura 10. Ademais, células tratadas com α -amanitina, lavadas e não exposta a UVC crescem da mesma forma que as células controle. No entanto, parte das células tratadas com α -amanitina e as controle, desafiadas com UVC permanecem em quiescência até 48h, como mostra a curva de crescimento, figura 10.

A

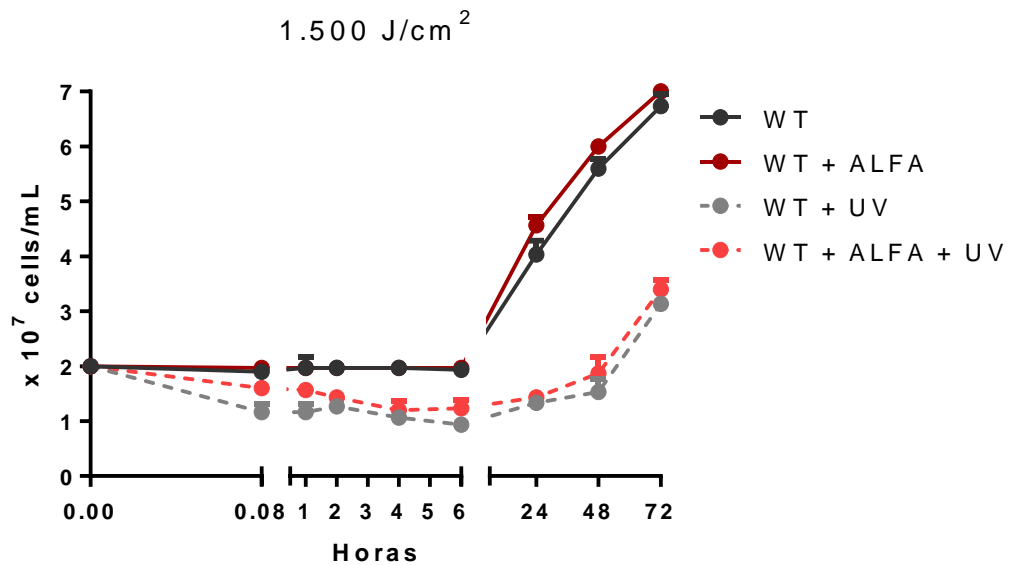


Figura 10 - Crescimento celular em células selvagem pré-tratadas com α -amanitina e expostas à UV: A) Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - linha preta) e tratadas com 1.500 J/cm^2 (WT + UV - linha cinza tracejada). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade da RNA polimerase II as células foram pré-tratadas com alfa-amanitina ($60 \mu\text{g} - 15 \text{ min}$). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm^2 (WT + ALFA + UV - linha vermelha tracejada) e controle pré-tratado, não desafiado com UV (WT+ALFA - linha vinho). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5', 1, 2, 4, 6, e 24h após irradiação UV.

A linhagem TcCSB $^{+/-}$, demonstra um fenótipo de resistência significativa à exposição UVC, que contrapõe a morte imediata observada na linhagem selvagem, logo após irradiação. No entanto, TcCSB $^{+/-}$ são mais sensíveis ao tratamento com UV após 24h. Em nosso estudo, ao descrever o efeito da inibição da atividade transcricional na linhagem TcCSB $^{+/-}$ pré-tratada com α -amanitina e exposta a UVC, observamos que o fenótipo não distingue significativamente do grupo TcCSB $^{+/-}$ exposto a UV e não tratado com o inibidor, logo após a exposição a UVC, como mostra o gráfico de sobrevivência (Figura 11 A). Ainda assim, a retomada da transcrição tem efeito deletério e progressivo com o passar das horas nas células TcCSB $^{+/-}$ tratadas levando-as à morte, similar ao observado na linhagem selvagem sob as mesmas condições, conforme a curva de crescimento nos tempos de 5', 1, 2, 4 e 6 horas após irradiação UVC (figura 11 B). Os dados também mostram que, durante a retomada da transcrição, dentre duas e quatro horas após UVC, células TcCSB $^{+/-}$ que estavam com a inicialização da transcrição abolida, são sinalizadas para a morte. Após 24 horas, as

células TcCSB^{+/-} tratadas com α -amanitina e não exposta a UVC crescem de forma igual às células não tratadas e selvagens controle. As células TcCSB^{+/-} tratadas e não tratadas com α -amanitina porém, desafiadas com UVC, permanecem em quiescência, até 72 horas, figura 11.

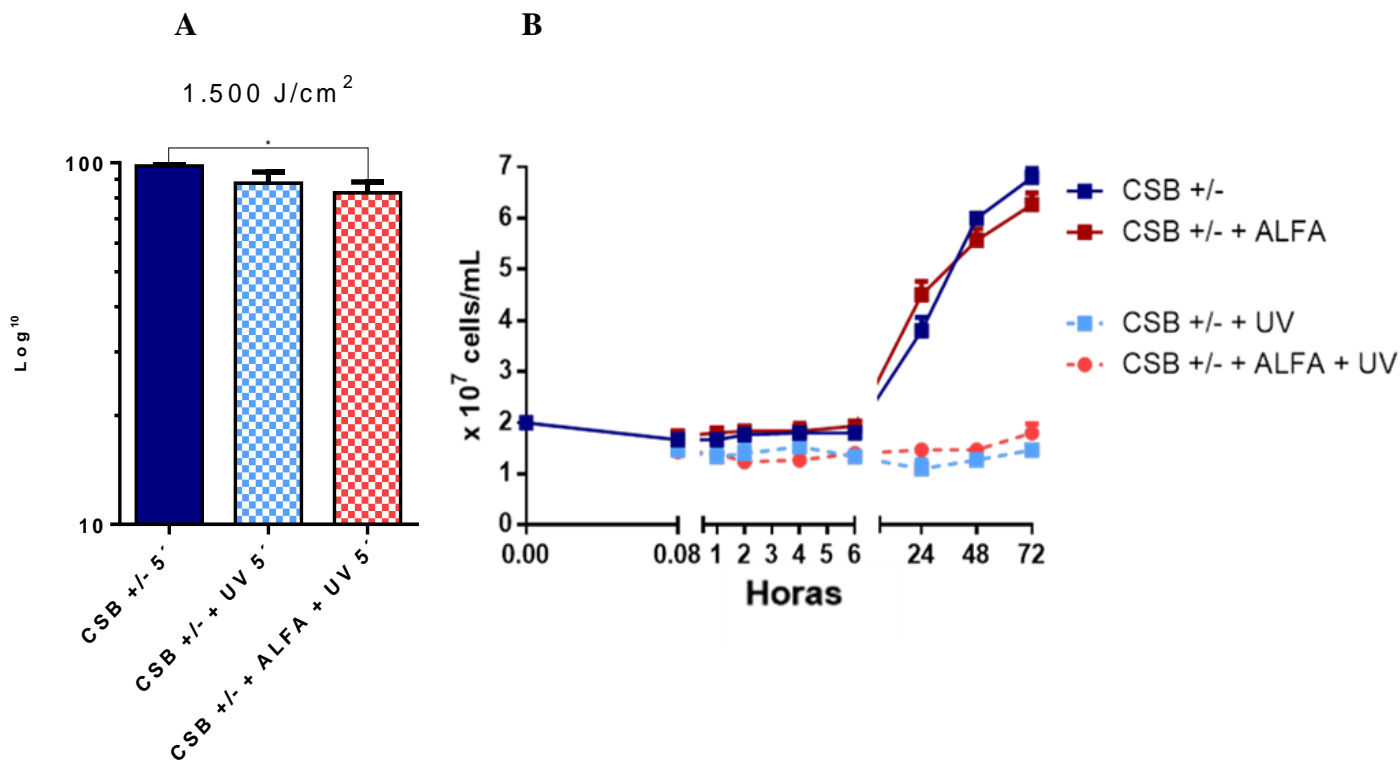


Figura 11 - Sobrevivência celular em células heminocaute de TcCSB pré-tratadas com α -amanitina e expostas à UV e crescimento celular: **A)** Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo CL Brener heminocaute de TcCSB (TcCSB^{+/-} - barra azul escuro) e tratadas com 1.500 J/cm² (CSB^{+/-} + UV - barra azul claro quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade da RNA polimerase II as células foram pré-tratadas com alfa-amanitina (60ug - 15 min). Em seguida, as células CSB^{+/-} foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (CSB^{+/-} + ALFA + UV - barra vermelho quadriculado). A sobrevivência foi determinada para a linhagem CSB^{+/-} controle e desafiadas com UV e também sob o efeito da inibição da transcrição. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰. **B)** Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo CL Brener heminocaute de TcCSB (TcCSB^{+/-} - linha azul escuro) e tratadas com 1.500 J/cm² (CSB^{+/-} + UV - linha azul claro tracejado). Para a inibição da atividade da RNA polimerase II as células foram pré-tratadas com alfa-amanitina (60ug - 15 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (CSB^{+/-} + ALFA + UV - linha vermelha tracejada) e controle pré-tratado, não desafiado com UV (CSB^{+/-} + ALFA - linha vinho). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5', 1, 2, 4, 6, e 24h após irradiação UV.

Por outro lado, a superexpressão de TcCSB não confere resistência a UV, os parasitos mostram uma morte acentuada ($p < 0,0001$), 5' após o tratamento, demonstrando a importância desse sensor em níveis adequados para a sinalização do TC-NER em *T. cruzi*. Em nosso estudo, o efeito fenotípico da inibição da atividade

transcricional, na linhagem TcCSB +++ pré-tratada com α -amanitina e exposta a UVC, se distingue significativamente do grupo TcCSB+++ (não tratado com α -amanitina.) Neste caso, as células TcCSB+++ com transcrição inibida possuem uma taxa de sobrevivência alta, logo após a exposição a UVC ($p < 0,0001$), como mostra o gráfico (Figura 12A), o que contrapõem o fenótipo das células não tratadas com α -amanitina que morrem logo após exposição a UV.

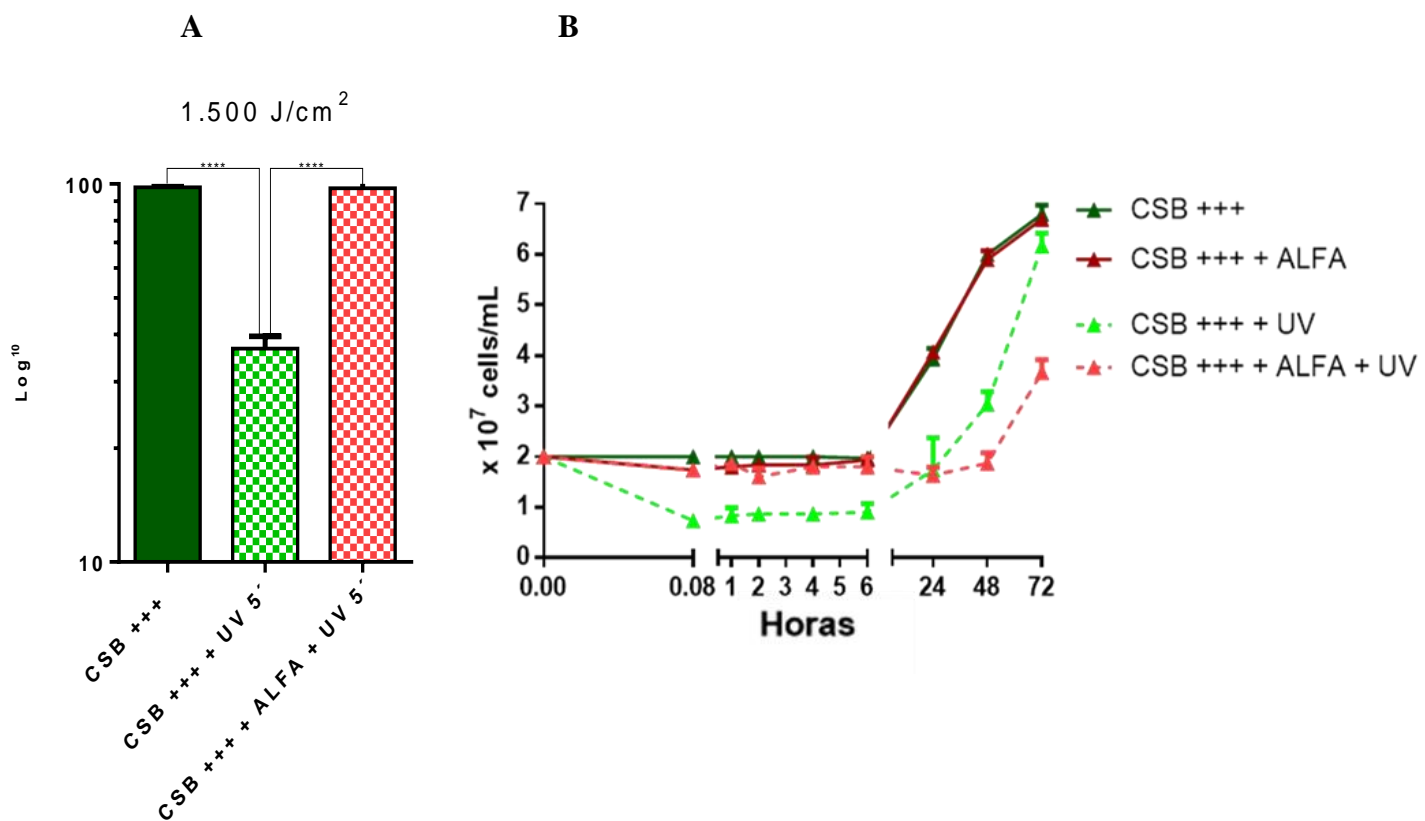


Figura 12 - Sobrevivência celular em células superexpressora de TcCSB tratadas com α -amanitina e expostas à UVC e crescimento celular: **A)** Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo CL Brener superexpressora de TcCSB (TcCSB+++ - barra verde escuro) e tratadas com 1.500 J/cm² (CSB+++ + UV - barra verde claro quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade da RNA polimerase II as células foram pré-tratadas com alfa-amanitina (60ug - 15 min). Em seguida, as células CSB+++ foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (CSB+++ + ALFA + UV - barra vermelho quadriculado). A sobrevivência foi determinada para a linhagem CSB+++ controle e desafiadas com UV e também sob o efeito da inibição da transcrição. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰. **B)** Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo CL Brener superexpressora de TcCSB (TcCSB+++ - linha verde escuro) e tratadas com 1.500 J/cm² (CSB+++ + UV - linha verde claro tracejado). Para a inibição da atividade da RNA polimerase II as células foram pré-tratadas com alfa-amanitina (60ug - 15 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (CSB+++ + ALFA + UV - linha vermelha tracejada) e controle pré-tratado, não desafiado com UV (CSB+++ + ALFA - linha vinho). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5', 1, 2, 4, 6, e 24h após irradiação UV.

Como descrito para as outras linhagens, a retomada da transcrição tem efeito deletério e progressivo com o passar das horas tanto nas células selvagens quanto nas TcCSB+/-, levando-as à morte. No entanto, conforme a curva de crescimento nos tempos de 5', 1, 2, 4 e 6 horas após irradiação UVC, figura 12B, os dados mostram que a retomada da transcrição não leva a morte dessas células superexpressoras de TcCSB sob a mesma condição. Esses dados indicam que a sinalização do TC-NER e DDR em TcCSB+++ seja distinta do observado na linhagem selvagem. Ademais, essa sinalização retarda a retomada de crescimento celular da linhagem TcCSB+++ tratada com α -amanitina e exposta a UVC que permanecem mais tempo em parada transitória de crescimento em relação ao que foi observado na linhagem selvagem, onde parte da população de células volta a crescer dentro de 48 horas. No entanto, essa retomada de crescimento é mais rápida na linhagem superexpressora irradiada não tratada com α -amanitina, ocorrendo 24h após irradiação diferente das linhagens selvagens e heminocaute.

4.2 A TRANSCRIÇÃO INIBIDA POR IRRADIAÇÃO GAMA CONFERE RESISTÊNCIA À UV-C.

Nosso grupo demonstrou que em *T. cruzi* a transcrição é inibida pela exposição à radiação ionizante (500Gy) durante o estágio não replicativo das células que se mantêm quiescentes até 96 horas após exposição (CHAME, D. F., 2018.; PASSOS-SILVA, D. G. 2010). A ausência da transcrição foi observada através da técnica de detecção de RNAs recém-sintetizados *ClickIT Click-iT™ RNA Alexa Fluor™ 594* (Thermo Fisher Scientific) que permite a detecção da transcrição global de RNA temporal. Como descrito por CHAME, D. F. em 2018, as células expostas à irradiação gama após 24 horas apresentaram maior coloração, indicando que o nível de transcrição não foi afetado pela radiação ionizante. No entanto, após 48 horas, os níveis de novos transcritos são baixos e não detectados, figura 13. Assim, considerando essa informação, células foram desafiadas com UVC horas após a exposição a irradiação gama a fim de verificar sua taxa de sobrevivência nos tempos 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120 e 144 horas.

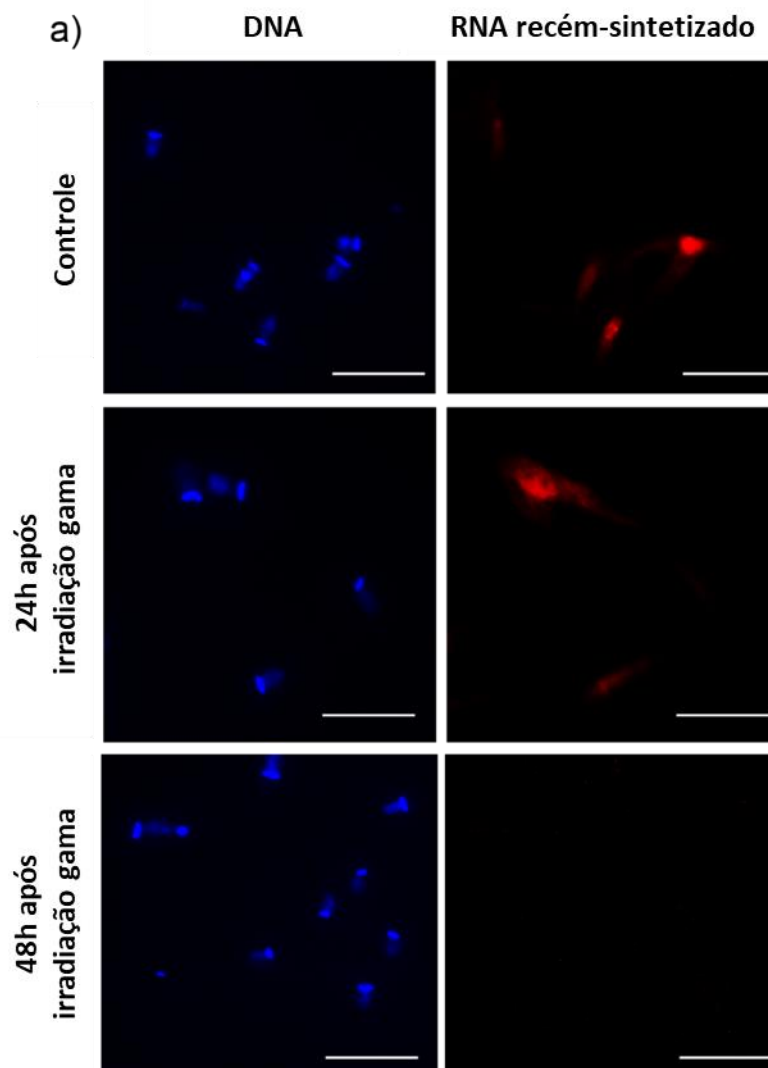


Figura 13 - Imunofluorescência para RNAs recém-sintetizados de epimastigotas de *T. cruzi* após exposição à radiação gama. a) A marcação do mRNA recém-sintetizado (*newly synthesized mRNA*) foi realizada usando o kit *click it RNA imaging* e o conjugado *Alexa Fluor 594* nos tempos de 24 e 48 horas após a irradiação gama. A coloração do DNA nuclear e do cinetoplasto foi realizada com Hoechst 33342. Fonte: CHAME, D. F., 2018.

O resultado mostra que, logo após a irradiação gama quando o processo de transcrição continua a funcionar (5', 8h e 24h), essas células apresentam sensibilidade à UVC semelhante ao que é observado com células não irradiadas nos tempos 5', 8h e 24h (Figura 14A e B). Porém, as células irradiadas com irradiação gama são mais resistentes à UVC quando o processo de transcrição está ausente, ou seja, 48 horas após a irradiação ($p < 0,0001$). Isso seria mais uma evidência de que danos gerados por UV-C na ausência de transcrição não sinalizam para a morte. Esse fenômeno de resistência à UV-C persiste até que as células irradiadas com gama retornem ao crescimento normal

após 120h, o que sugere que a inibição da síntese de novos RNAs ocorra no intervalo de 48 ($p < 0,001$) até 96 horas ($p < 0,0001$) do intervalo de quiescência celular induzida por radiação gama e assim esses dados apoiam a evidência de que a morte por UV-C é dependente de um processo de transcrição ativo.

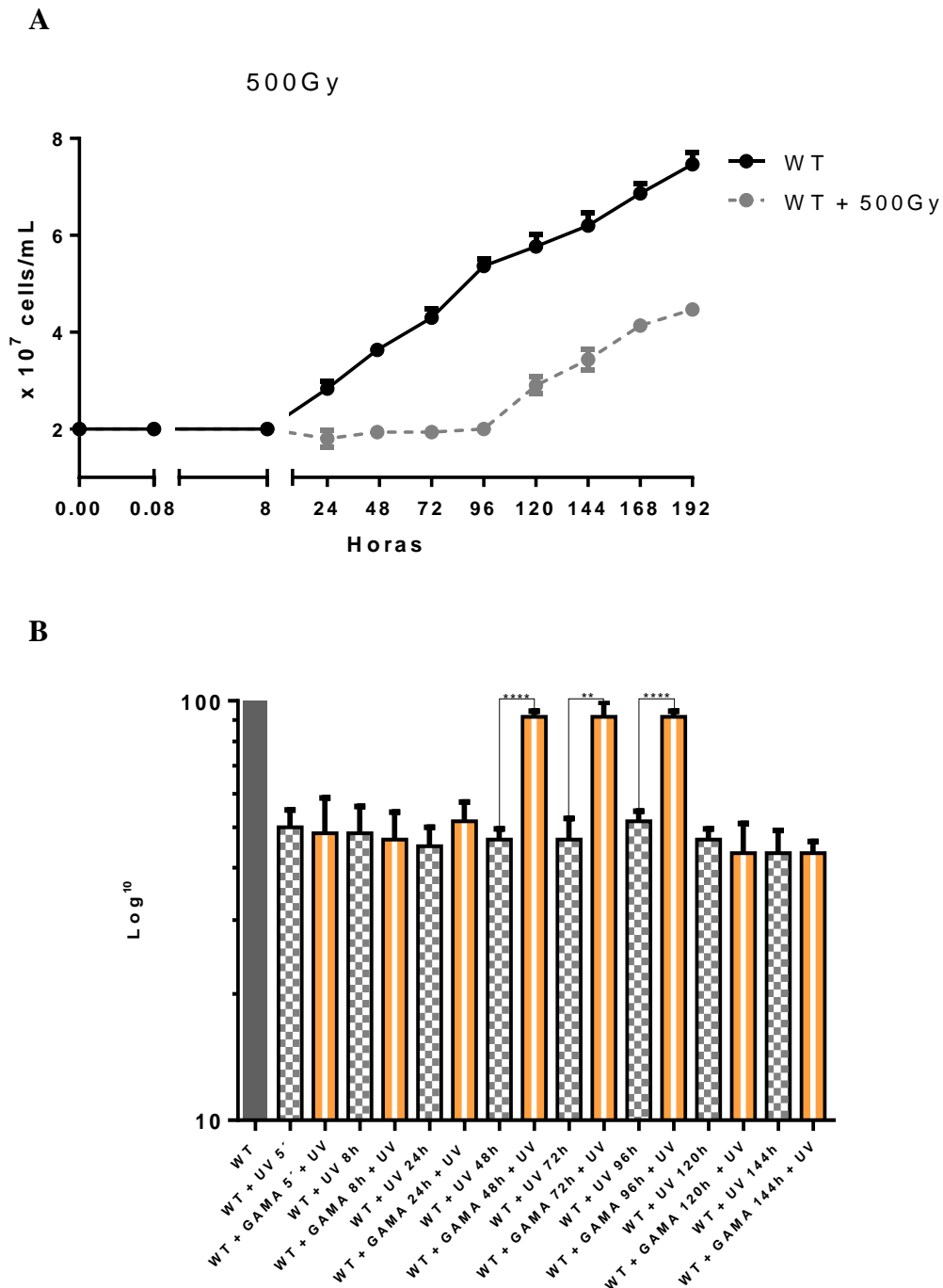


Figura 14: A) Curva de crescimento celular em células selvagem controle e tratadas com 500Gy: Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - linha preta) e tratadas com 500Gy (WT+500Gy – linha cinza tracejada), nos tempos: 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120, 144, 168 e 192 horas. **B) Sobrevivência celular de células selvagem controle e pré-tratadas com irradiação ionizante desafiadas com irradiação UV.** Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - barra cinza) e tratadas com 1.500 J/cm² (WT + UV – barra cinza

quadriculado). Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo selvagem CL Brener pré-tratadas com 500Gy e desafiadas com 1.500 J/cm² (WT + GAMA + UV – barra laranja), nos tempos 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120 e 144h. A sobrevivência à UVC foi determinada onde percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Porcentagem de sobrevivência em Log¹⁰.

4.3 *Trypanosoma cruzi* APRESENTA RESISTÊNCIA À EXPOSIÇÃO UV DEPENDENTE DA FASE DO CICLO CELULAR.

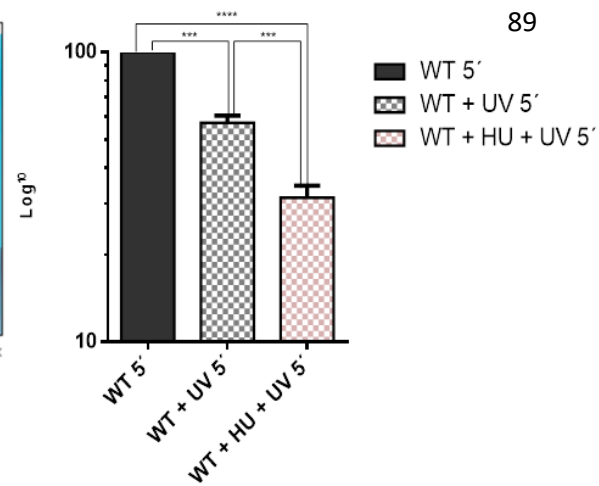
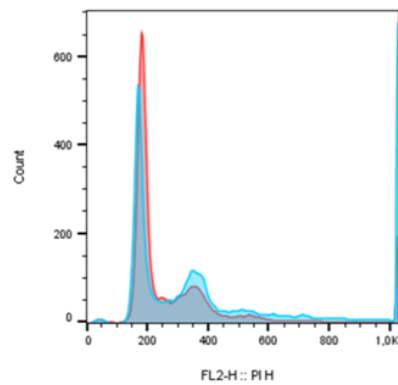
Na ocorrência de danos ao DNA, a escolha do sistema de reparo a usar depende tanto do tipo de lesão quanto da fase do ciclo celular da célula. Os quais podem influenciar o reparo acoplado à transcrição a DDR e a sobrevivência da célula (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). Em *T. brucei*, as relações entre a transcrição ativa colapsada por danos ao DNA em fases específicas do ciclo celular foram descritas por Marcelo da Silva e colaboradores (2019) e relatam que o panorama de transcrição é dependente do ciclo celular. Demonstrou-se que esse organismo não limita sua transcrição e a mesma ocorre durante todas as fases do ciclo celular (G0 / G1, S e G2 / M), incluindo a fase de replicação (S), o que pode levar a potenciais colisões entre a maquinaria de replicação e a transcrição (DA SILVA, S.M., et al 2019). Assim, considerando essas informações, descrevemos a influência das fases do ciclo celular na sinalização de morte após o tratamento com UV em *T. cruzi*. Desse modo, para investigar a influência das fases do ciclo celular em resposta a exposição à radiação UVC a linhagem selvagem foi sincronizada com o pré-tratamento com hidroxiuréia (HU), (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 20 mM por 24 horas como descrito por UMAKI, A. C. em 2013.

A HU inibe a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, responsável por converter ribonucleosídeos-difosfato em precursores de desoxirribonucleotídeos, desse modo à síntese de DNA é inibida levando à sincronização das células em G1 (WRIGHT et al., 1990). Os parasitos da linhagem selvagem tratados e não tratados com HU foram analisados através de citometria de fluxo (FACS), pela marcação com iodeto de propídeo, e os resultados são apresentados na forma de histogramas, os quais são sobrepostos no gráfico células não sincronizadas (controle, em azul) e células sincronizadas (tratadas, em vermelho), figura 15. O ponto 0h representa o momento de liberação da HU, onde os parasitos foram impedidos de continuar o ciclo celular a partir da fase G1/S, o histograma mostra o pico de G1 muito mais pronunciado nas células

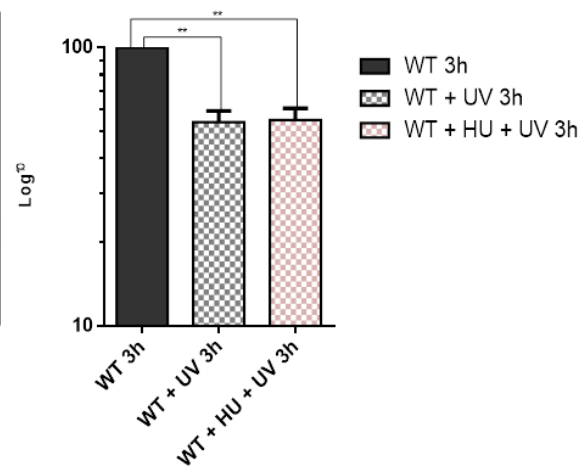
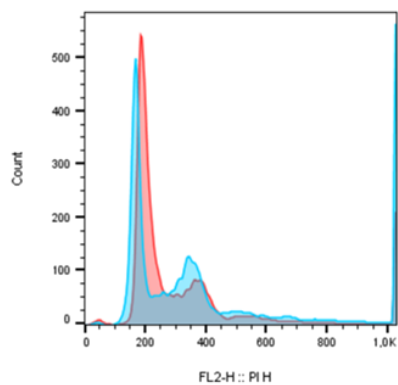
tratadas em relação ao controle, confirmando a eficiência do tratamento com HU. Esse e os demais pontos são correspondentes às respectivas fases do ciclo celular: G1 (5); início de S (3h); S (6h) e G2 (20h), respectivamente, como descrito por (MENDES, I 2015). Nos tempos mencionados, alíquotas de células foram coletadas e essas desafiadas com radiação UVC 1.500 J/cm² e sua sobrevivência determinada.

Os resultados demonstram que há relações entre as fases do ciclo celular e a sobrevivência das células selvagens à exposição UVC, figura 15. Célula selvagem na fase G1 (0h) foram significativamente mais sensíveis à UVC que as células controle não sincronizadas e desafiadas ($p < 0,0007$). Esses dados sugerem que a sinalização de danos ao DNA em G1 tem perfil pró-apoptótico. Ademais, as fases: correspondentes ao início de S (3h – $p < 0,8$) e fase S (6h – $p < 0,8$) do ciclo celular não influenciam significativamente a taxa de sobrevivência do parasito à exposição UVC (Figura 15). Entretanto, a fase G2 do ciclo celular (20h) está relacionada à resistência do parasito à exposição UV, figura 15. O histograma mostra que a célula selvagem em G2 foram significativamente mais resistentes ($p < 0,02$) que a célula selvagem não sincronizadas e desafiadas com UV. Assim, a fase G2 do ciclo celular está relacionada a uma sinalização de resposta a danos ao DNA de caráter anti-apoptótico.

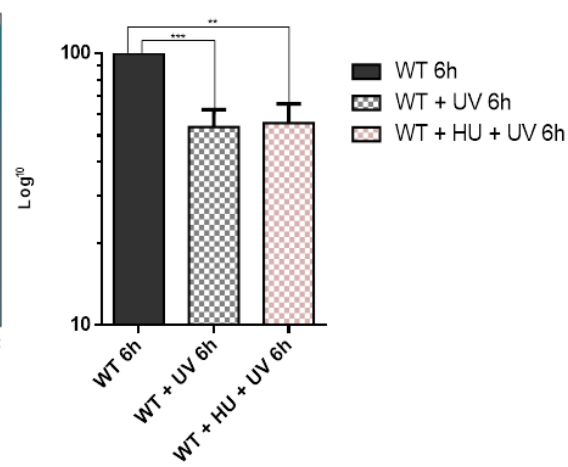
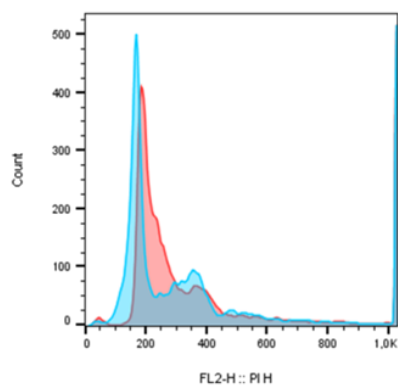
WT
5' / G1



WT
3h / início
de S



WT
6h / S



WT
20h / G2

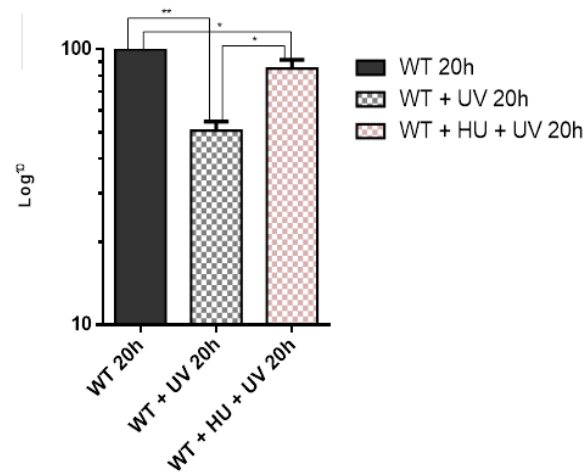
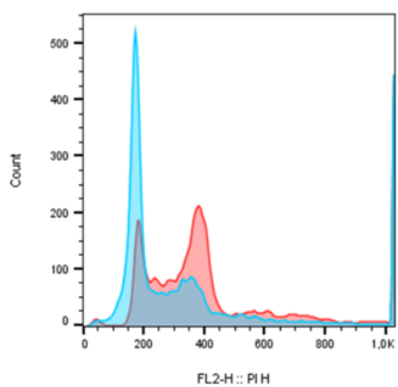


Figura 15 - Análise de sobrevivência celular à UVC ciclo celular fase-dependente: Análise do ciclo celular e sobrevivência celular. As células selvagens foram sincronizadas com hidroxipuréia (20 mM) e o ciclo celular foi determinado por FACS. Para a marcação do conteúdo de DNA foi usado iodeto de propídeo. As amostras foram lidas no aparelho FACScan (*Benckton-Dickson*) e os resultados analisados em forma de histograma no programa FlowJo v10. Os resultados são apresentados na forma de histogramas, os quais são sobrepostos no gráfico, células não sincronizadas (controle, em azul) e células sincronizadas (tratadas, em vermelho) nos tempos 5', 3 horas, 6 horas e 20 horas que confere-se a fase G1/ início de S/ S e G2 do ciclo celular, respectivamente, para células sincronizadas. Após a sincronização, as células foram tratadas com 1500 J/m² e a taxa sobrevivência determinada para células epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - barra cinza) e tratadas com 1.500 J/cm² (WT + UV - barra cinza quadriculado e célula selvagem sincronizada em fase do ciclo celular e tratadas com 1.500 J/cm² (WT + HU + UV - barra rosa quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação á respectiva cultura controle não tratada. Resultados representativos de três experimentos independentes. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰.

4.4 FENÓTIPO DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS SUPEREXPRESSORA E HEMINOCAUTE DO GENE RPA DE *T. cruzi* EM RESPOSTA AO ESTRESSE GENOTÓXICO INDUZIDO POR UVC.

Nossos resultados permitem concluir que as fases G1 e G2 do ciclo celular afetam a sobrevivência à exposição UVC em *T. cruzi*, visto que quando o parasito está em fase G1 a exposição a UV leva à morte (pró-apoptótico) e enquanto que quando está em fase G2 a exposição a UV leva a sobrevivência do parasito (anti-apoptótico). No trabalho de Marcelo da Silva e colaboradores (2019) os resultados sugerem que lesões de DNA dependentes da transcrição são geradas endogenamente em *T. brucei*, predominantemente durante a fase G1 e permanecem até G2 quando o parasito repara o dano e a fosforilação de γ H2A é removida. Do mesmo modo que γ H2A, *T. brucei* mostra níveis endógenos de R-loops ao longo das fases G1/S e G2, que se tornam raros durante a mitose e citocinese. Além disso, quando a transcrição é inibida, há uma diminuição nos *foci* fluorescentes da co-localização de γ H2A e R-loops em pontos que marcam regiões de conflito de replicação e a transcrição (DA SILVA, S.M., et al 2019). Essas evidências nos levaram a questionar qual a relação entre a transcrição ativa na etapa inicial de síntese que é cometida por danos na fase G1 e a sinalização pró-apoptótica? Ademais, em *T. cruzi* essa sinalização de morte em G1 é dependente da formação de R-loops em local de início de transcrição colapsado por UV?

A revelação de correlações entre conflitos da transcrição gerados por danos ao DNA e formação de R-loop estabelece um novo nível de complexidade na biologia de R-loop, em particular em associação com vias de resposta de dano de DNA mediadas

por ATR e ATM (HAMPERL, S. et al., 2017). O *R-loop* pode surgir durante a parada da RNA polimerase diante de um dano na fita de DNA, a molécula de RNA recém-sintetizada pode se parear com a fita de DNA molde, formando uma estrutura composta por um híbrido de DNA/RNA e uma fita simples de DNA deslocada, sendo essa estrutura denominada *R-loop* e tem sido implicada em diversas condições fisiológicas celulares deletérias (ROY et al, 2010; SANTOS-PEREIRA e AGUILERA, 2015). Como mencionado anteriormente, em *T. brucei* os resultados sugerem que *R-loop* é gerado em regiões de conflitos de transcrição (DA SILVA, S.M., et al 2019).

Nesse contexto, trabalhos recentes têm demonstrado à participação da proteína RPA (*Replication Protein A*) ligadora de fita simples de DNA na via de DDR. As funções de RPA na via de resposta a danos ao DNA é descrita durante a geração de um duplex curto (~ 8-10 bp) RNA-DNA dentro do "complexo de transcrição". A fita revestida por RPA (RPA-ssDNA) são fosforilados por ATR e constitui um sinal fisiológico essencial para ativar essa via, sendo o complexo alvo-chave e um importante regulador das modificações pós-traducionais na DDR (CICCIA E ELLEDGE, 2010; MARECHAL E ZOU, 2015). Em *T. cruzi*, ainda não foram descritas as participações de TcRPA para a via de sinalização a danos ao DNA no contexto do estresse transcricional em especial para as regiões de início de transcrição colapsada propensas a formação de estruturas de *R-loops*. Logo, questionamos as possíveis correlações de TcRPA com as cinases TcATM/TcATR e a DDR assim como a sua cooperação na resolução de *R-loops*. Desse modo, nesse trabalho realizamos estudos para a compreensão de suas funções e correlações com os fenótipos celulares após UV em *T. cruzi*.

Em vista disso, realizamos experimentos que buscam evidências da participação de TcRPA para a DDR do TC-NER em *T. cruzi*. Os dados demonstram que a linhagem superexpressora de TcRPA submetida à irradiação UVC apresenta um fenótipo de resistência a exposição a UV. Por outro lado, a linhagem heminocaute para o gene TcRPA desafiada com UV é mais sensível em relação à cepa WT ($p < 0,001$) e sua taxa de sobrevivência é menor (figura 16). Outro fenótipo observado ao acompanhar o crescimento das células desafiadas é a variação dos níveis de RPA influenciam a retomada de crescimento, visto que os fenótipos de resistência a UVC são distintos entre as linhagens selvagem, superexpressora e heminocaute durante 48 horas após a irradiação UV. Nesse tempo, observamos que grande parte das células que

superexpressam TcRPA voltaram a crescer. Por outro lado, apenas uma pequena parte da linhagem selvagem retoma o crescimento. Enquanto que as células da linhagem heminocaute permanecem transitoriamente paradas até 48 horas após UV (figura 17). Logo, demonstramos que possivelmente o excesso de RPA recobrando fitas ssDNA protege de alguma forma a célula da morte durante danos gerados por UV evitando a sinalização de morte. Além do mais, o excesso de TcRPA relaciona-se a uma retomada mais rápida do crescimento após UV. Assim, a TcRPA pode ser uma importante mediadora das interlocuções entre as proteínas da DDR e o TC-NER influenciado a sinalização após danos gerados por UV.

A

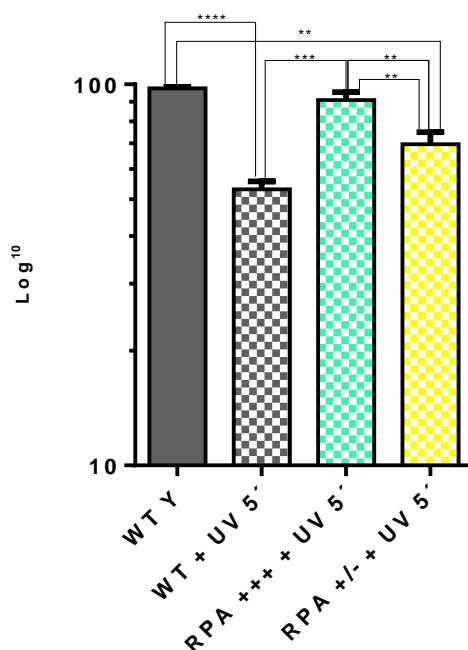


Figura 16 - Sobrevivência de células selvagem e linhagens superexpressora e heminocaute de TcRPA de *T. cruzi* expostas à UVC: A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas desafiadas com 1.500 J/cm² das linhagens selvagem cepa Y (WT+UV – barra cinza quadriculado); superexpressora de TcRPA (TcRPA+++ +UV - barra verde claro quadriculado); heminocaute de TcRPA (TcRPA+/- + UV – barra amarela quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivência em Log¹⁰.

A

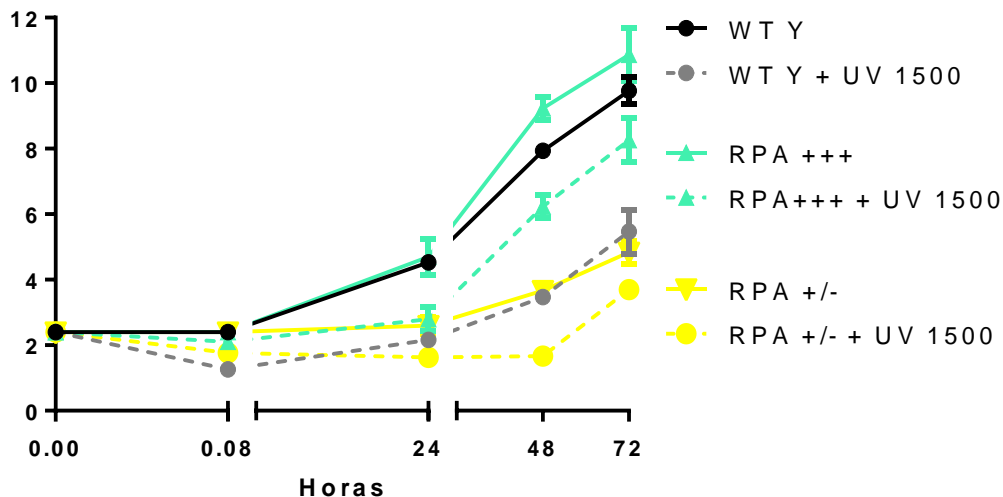


Figura 17 – Crescimento celular de células selvagem e linhagens superexpressora e heminocaute de TcRPA de *T. cruzi* expostas à UVC: A) Curva de crescimento de células epimastigotas desafiadas com 1.500 J/cm² das linhagens selvagem cepa Y (WT+UV – linha cinza tracejado); superexpressora de TcRPA (TcRPA+++ +UV - linha verde claro tracejado); heminocaute de TcRPA (TcRPA+/- + UV – linha amarela tracejado). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5', 24, 48, 72 horas após irradiação UV. A linha contínua, em cinza, verde e amarela representa as células controle não desafiadas com UV.

4.5 IDENTIFICAÇÕES DOS SUPOSTOS HOMÓLOGOS DOS GENES RNASEH1 E RNASEH2A EM *Trypanosoma cruzi*.

Nossos resultados anteriores demonstram que TcRPA pode ser uma importante mediadora das interlocuções entre as proteínas da DDR e o TC-NER e tem um papel relacionado a sobrevivência celular em *T. cruzi* após UV. Trabalhos recentes relatam que a RPA interage com a proteína RNaseH1 e colocaliza-se com RNaseH1 e *R-loops* em células humanas. Assim, foi proposto que a interação RPA-RNase H1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados ao *R-loop* e morte celular (NGUYEN, H. D. et al., 2017; BELOTSEKOVSKII, P. B. et al., 2018). Porém, caso os híbridos DNA/RNA sejam formados, esses podem ser desfeitos pela ação de enzimas RNases H que degradam a porção de RNA que interage com o DNA (SANTOS-PEREIRA, J. M. & AGUILERA, A., 2015). Ademais, os mutantes de RNaseH1 defeituosos na ligação de RPA não digerem eficientemente híbridos de RNA-DNA *in vivo* o que leva ao acúmulo de *R-loops*, resultando em instabilidade genômica. Desse modo, foi proposto que a interação cooperativa entre RPA-RNase H1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados a *R-loop*. Considerando as informações anteriores, continuamos a investigar o papel de *R-loops* que são formados no início da

transcrição colapsada por danos no DNA e sua participação na sinalização de morte em *T. cruzi* através dos estudos dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A.

Para predição e identificação dos supostos homólogos dos genes que codificam as proteínas RNaseH1 e RNaseH2A de tripanossomatídeos utilizou-se a ferramenta de bioinformática *PSI-BLAST*. O resultado para RNaseH1 prediz um alelo conservado em *T. cruzi* (CL Brener), alelo 1: TcCLB.506351.40 (*Esmeraldo-Like*) e o alelo 2 TcCLB.505939.60 (*Non-Esmeraldo-like*). O alelo 1 e 2 apresentaram valor de identidade (28%) e similaridade (41%) quando comparados com a sequência da RNaseH1 humana. O valor de E atribuído ao alinhamento foi de 2×10^{-161} para o alelo *Esmeraldo-Like* e de 8×10^{-134} para o alelo *Non-Esmeraldo-like* o que revela a conservação entre as sequências comparadas. O resultado para RNaseH2A prediz um alelo conservado em *T. cruzi* (CL Brener), alelo 1: TcCLB.510293.70 *Esmeraldo-Like* e o alelo 2 TcCLB.508661.50 CL- *Non-Esmeraldo-like*. O alelo 1 apresentou valor de identidade (32%) e similaridade (47%) quando comparados com a sequência da RNaseH2A humana. O valor de E atribuído ao alinhamento foi de 5×10^{-179} , o que revela a conservação entre as sequências comparadas. O alelo 2 apresentou valor de identidade (33%) e similaridade (49%) quando comparados com a sequência da RNaseH2A humana. O valor de E atribuído ao alinhamento foi de 5×10^{-179} para o alelo *Esmeraldo-Like* e de 7×10^{-158} para o alelo *Non-Esmeraldo-like* o que revela a conservação entre as sequências comparadas.

Organismo	RNAaseH1	RNAaseH2A
<i>Trypanosoma cruzi</i> - CL- Brener <i>Esmeraldo-Like</i>	TcCLB.506351.40	TcCLB.510293.70
<i>Trypanosoma cruzi</i> - CL- Brener <i>Non-Esmeraldo-Like</i>	TcCLB.505939.60	TcCLB.508661.50

Tabela 3: Supostos homólogos dos genes que codificam para as proteínas RNaseH1 e RNaseH2A em *T. cruzi*.

4.5.1 Domínios proteicos conservados na sequência das proteínas hipotéticas Tc.506351.40 e Tc.505939.60 supostas homólogas de RNaseH1 em *Trypanosoma cruzi*.

Para identificar os domínios conservados presentes nas sequências dos homólogos das proteínas hRNaseH1 em *T. cruzi* (TcCLB.506351.40 e TcCLB.505939.60), utilizamos os softwares Pfam (FINN et al., 2016) e *Position Specific Iterated- BLAST (PSI-BLAST)*, (ALTSCHUL et al., 1990), considerando significativos os valores de $E < 10^{-7}$. A análise revelou a presença de ambos os domínios conservados pertencentes à família *RNaseH*. Além disso, foi identificado um domínio conservado pertencente à família de proteínas *Cauli VI*, conforme a tabela 4 para o alelo *Esmeraldo-Like* e tabela 5 para o alelo *Non-Esmeraldo-Like*.

Família	Descrição	Classificação	Alinhamento		E-value
			Início	Fim	
RNase H	RNase H	Domínio	141	262	8.8×10^{-23}
RNase H	RNase H	Domínio	280	314	3.3×10^{-7}
Cauli VI	Caulimovirus	Domínio	9	52	5.5×10^{-19}

Tabela 4: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNaseH1 de *T. cruzi* (cepa CL Brener – alelo *Esmeraldo-Like*), TcCLB.506351.40. Os aminoácidos correspondentes ao domínio conservado encontrado na sequência estão disponíveis na coluna (alinhamento).

Família	Descrição	Classificação	Alinhamento		E-value
			Início	Fim	
RNase H	RNase H	Domínio	141	262	1.3×10^{-23}
RNase H	RNase H	Domínio	280	314	1.3×10^{-7}
Cauli VI	Caulimovirus	Domínio	9	52	5.5×10^{-19}

Tabela 5: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNaseH1 de *T. cruzi* (cepa CL Brener- alelo *Non-Esmeraldo-Like*), TcCLB.505939.60. Os aminoácidos correspondentes ao domínio conservado encontrado na sequência estão disponíveis na coluna (alinhamento).

4.5.2 Domínios proteicos conservados na sequência das proteínas hipotéticas Tc.510293.70 e Tc.508661.50 supostas homólogas de RNaseH2A em *Trypanosoma cruzi*.

Para identificar os domínios conservados presentes nas sequências dos homólogos das proteínas hRNaseH2A em *T. cruzi* (TcCLB.510293.70 e TcCLB.508661.50), utilizamos os softwares Pfam (FINN et al., 2016) e *Position Specific Iterated- BLAST (PSI-BLAST)*, (ALTSCHUL et al., 1990), considerando significativos os valores de $E < 10^{-7}$. A análise revelou a presença do domínio conservado característico de proteínas dessa família, o qual foi denominado como *Ribonuclease HII*, conforme descrito na tabela 6 e 7, para ambos os alelos.

Família	Descrição	Classificação	Alinhamento		E-value
			Início	Fim	
RNase HII	Ribonuclease HII	Domínio	42	246	7.0×10^{-42}

Tabela 6: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNaseH2A de *T. cruzi* (cepa CL Brener - alelo *Esmeraldo-Like*), TcCLB.510293.70. Os aminoácidos correspondentes ao domínio conservado encontrado na sequência estão disponíveis na coluna (alinhamento).

Família	Descrição	Classificação	Alinhamento		E-value
			Início	Fim	
RNase HII	Ribonuclease HII	Família	42	246	4.5×10^{-19}

Tabela 7: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da RNaseH2A de *T. cruzi* (cepa CL Brener - alelo *Esmeraldo-Like*), TcCLB.508661.50. Os aminoácidos correspondentes ao domínio conservado encontrado na sequência estão disponíveis na coluna (alinhamento).

4.6 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS SUPEREXPRESSORA DO GENE RNASEH1 E RNASEH2A DE *T. cruzi*.

4.6.1 Clonagem e Subclonagem dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A.

Os genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A foram amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, clone CL Brener, de modo que cada *amplicon* estivesse flanqueado, à 5' e a 3', pelos sítios das enzimas de restrição XbaI e XhoI para cada gene em estudo. As sequências gênicas de TcRNaseH1 e TcRNaseH2A de *T. cruzi* possuem um tamanho, em pares de base, correspondente a 972 pb e 975 pb, respectivamente (Figura 18). Na primeira etapa, esses *amplicons* foram clonados no vetor pGEM-T-*Easy* separadamente para cada gene em estudo. Após a transformação bacteriana, selecionamos as colônias positivas por PCR (confirmação do inserto), figura 19, e por digestão dos plasmídeos com as enzimas XbaI e XhoI a fim de liberar um fragmento de tamanho correspondente aos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A clonados, figura 20.

Posteriormente, utilizamos os insertos dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A para clonagem no vetor pROCK-Neo, o qual permite a superexpressão do gene alvo através de sua integração ao genoma do parasito através de recombinação homóloga no locus de alfa-tubulina, onde estão situadas múltiplas cópias alternadas dos genes codificadores de alfa e beta tubulina (DaROCHA, W. D. R. et al., 2004). Após a transformação bacteriana, selecionamos as colônias positivas por PCR (confirmação do inserto) e por digestão dos plasmídeos com as enzimas XbaI e XhoI a fim de liberar um fragmento de tamanho correspondente aos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A clonados em pROCK-Neo, figura 21.

Após confirmação da clonagem, os plasmídeos pROCKNeo+TcRNaseH1 e pROCKNeo+TcRNaseH2A foram sequenciados pelo método de Sanger e cada sequência *contig* foi alinhada com o gene TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, respectivamente a fim de confirmar a identidade dos mesmos. Os alinhamentos reportaram uma identidade acima de 99%, confirmando a integridade dos genes em estudo subclonados no vetor pROCK-Neo. Esses plasmídeos foram linearizados pela digestão da enzima de restrição NotI e utilizados na transfecção de formas epimastigotas

de *T. cruzi* a fim de obter a linhagem superexpressora do gene TcRNaseH1 e linhagem superexpressora do gene TcRNaseH2, respectivamente.

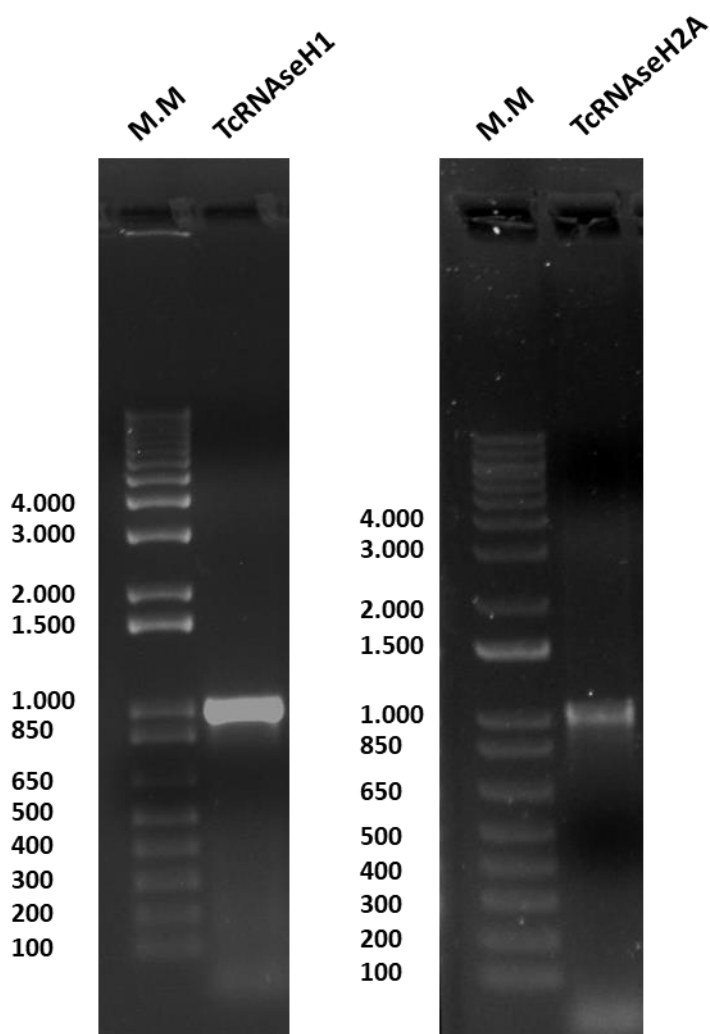


Figura 18 – Amplificação do gene TcRNaseH1 e TcRNaseH2A por PCR. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, demonstrando o resultado da reação de amplificação do gene TcRNaseH1, 972 pb (painel à esquerda – coluna 2). Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, demonstrando o resultado da reação de amplificação do gene TcRNaseH2A, 975 pb (painel à direita – coluna 2). Coluna 1: marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder.

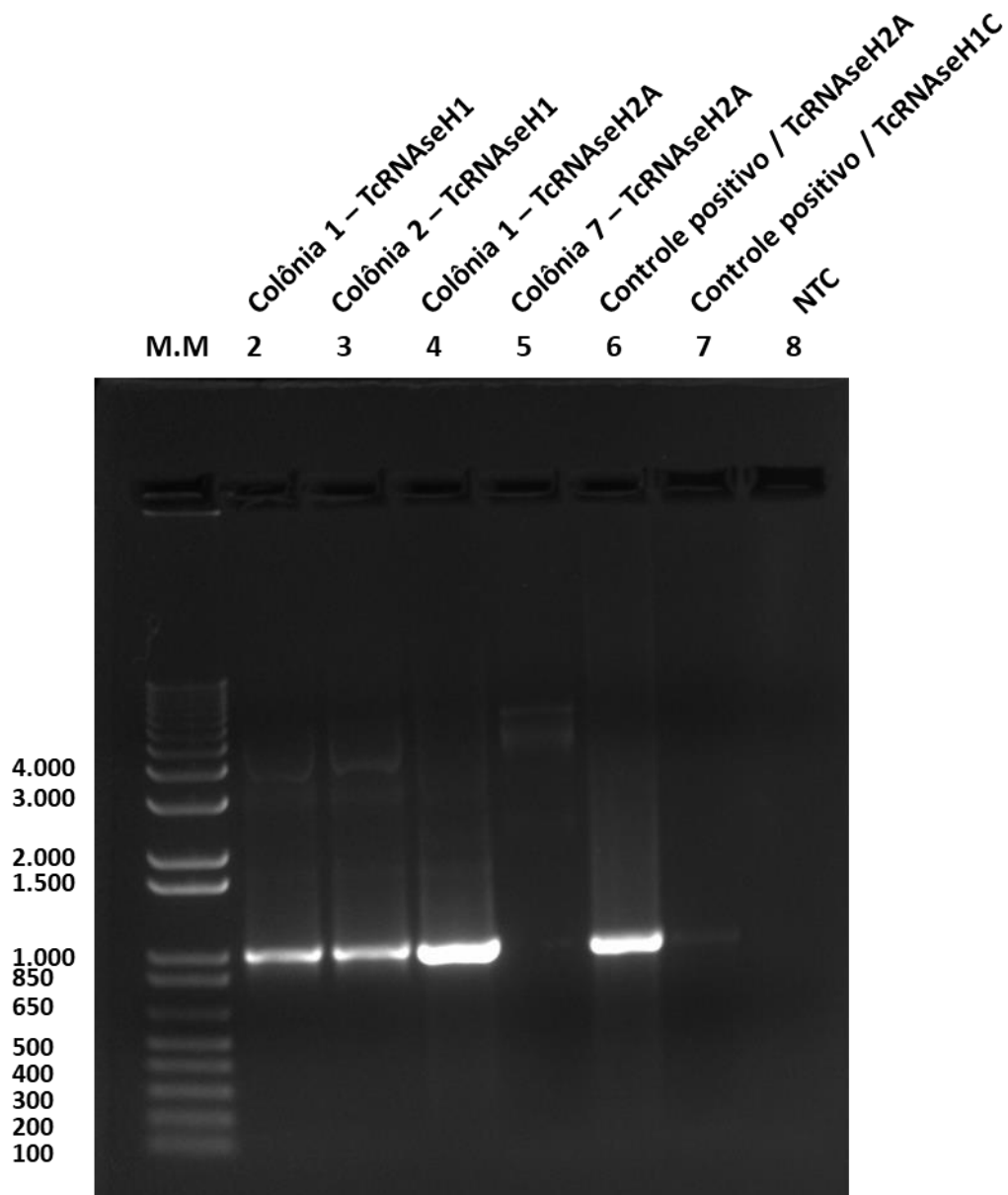


Figura 19 – Reação de PCR de colônias para amplificação dos genes em estudo TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, respectivamente. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, demonstrando o resultado da reação de PCR de colônias para os genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, que possuem um tamanho, em pares de base, correspondente a 972 pb e 975 pb, respectivamente. Legenda: **Coluna 1)** marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder; **Coluna 2)** produto da reação de PCR de colônias para o gene TcRH1 (colônia 1); **Coluna 3)** produto da reação de PCR de colônias para o gene TcRH1 (colônia 2); **Coluna 4)** produto da reação de PCR de colônias para o gene TcRH2A (colônia 1); **Coluna 5)** produto da reação de PCR de colônias para o gene TcRH2A (colônia 7); **Coluna 6)** controle positivo da reação de PCR de colônias do gene TcRH2A; **Coluna 7)** controle positivo da reação de PCR de colônias do gene TcRH1; **Coluna 8)** controle negativo (NTC).

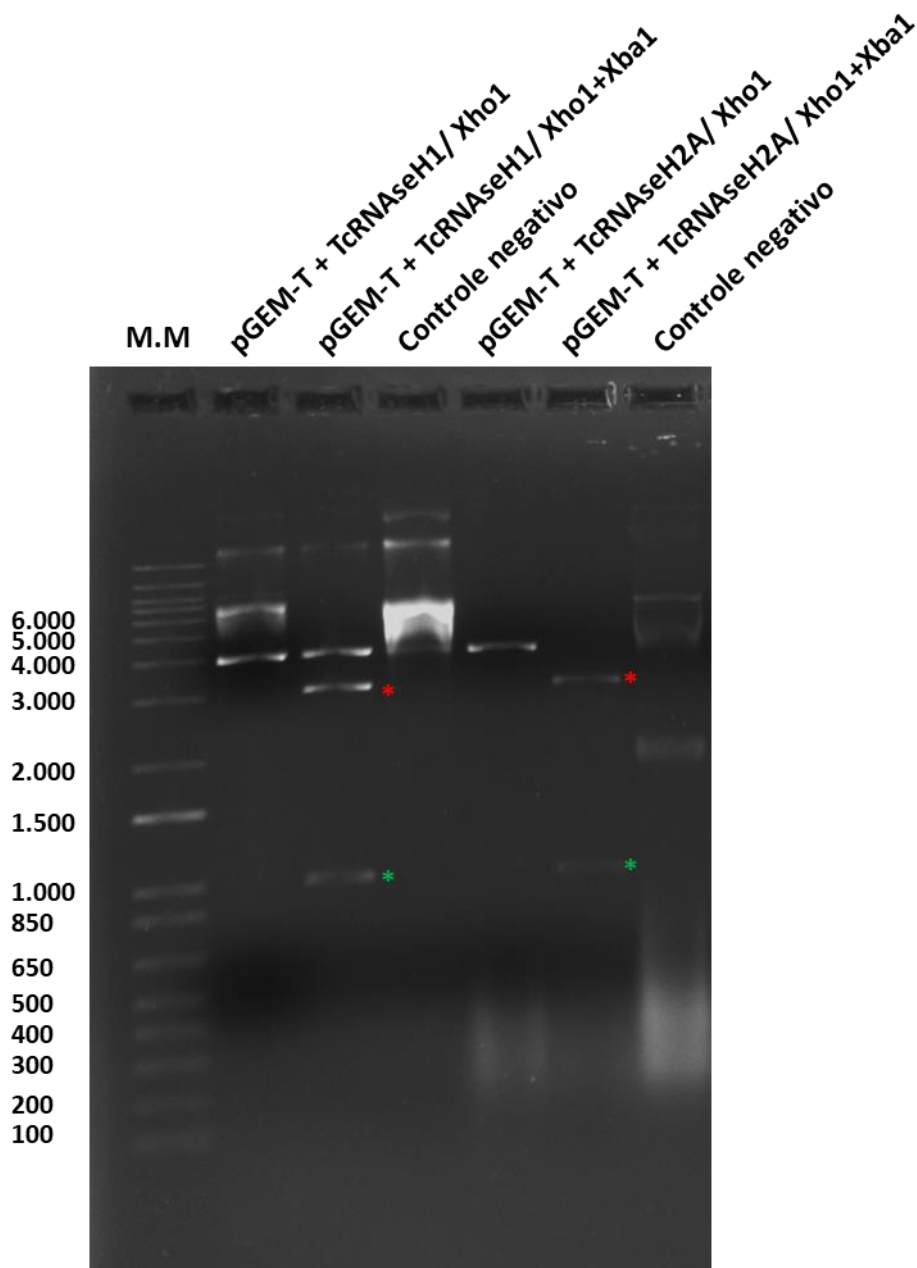


Figura 20 – Digestão enzimática dos plasmídeos pGEM-T-Easy+TcRNaseH1 e pGEM-T-Easy+TcRNaseH2A, respectivamente. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, demonstrando o resultado da digestão enzimática dos plasmídeos com resultado positivo para a PCR dos genes TcRH1 e TcRH2A, respectivamente. Legenda: **Coluna 1)** marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder; **Coluna 2)** alíquota 1 > digestão parcial com Xho1 de pGEM-T-Easy +TcRH1, banda de ~4.000 pb; **Coluna 3)** alíquota 2 > digestão dupla Xho1+Xba1 de pGEM-T-Easy +TcRH1, banda de ~3.000pb e ~1.000; **Coluna 4)** controle negativo (plasmídeo não-digerido); **Coluna 5)** alíquota 1 > digestão com Xho1 de pGEM-T-Easy +TcRH2A, banda de ~4.000 pb; **Coluna 6)** digestão dupla Xho1+Xba1 de pGEM-T-Easy+TcRH2A, banda de ~3.000 pb e ~1.000 pb ; **Coluna 7)** controle negativo (plasmídeo não digerido).

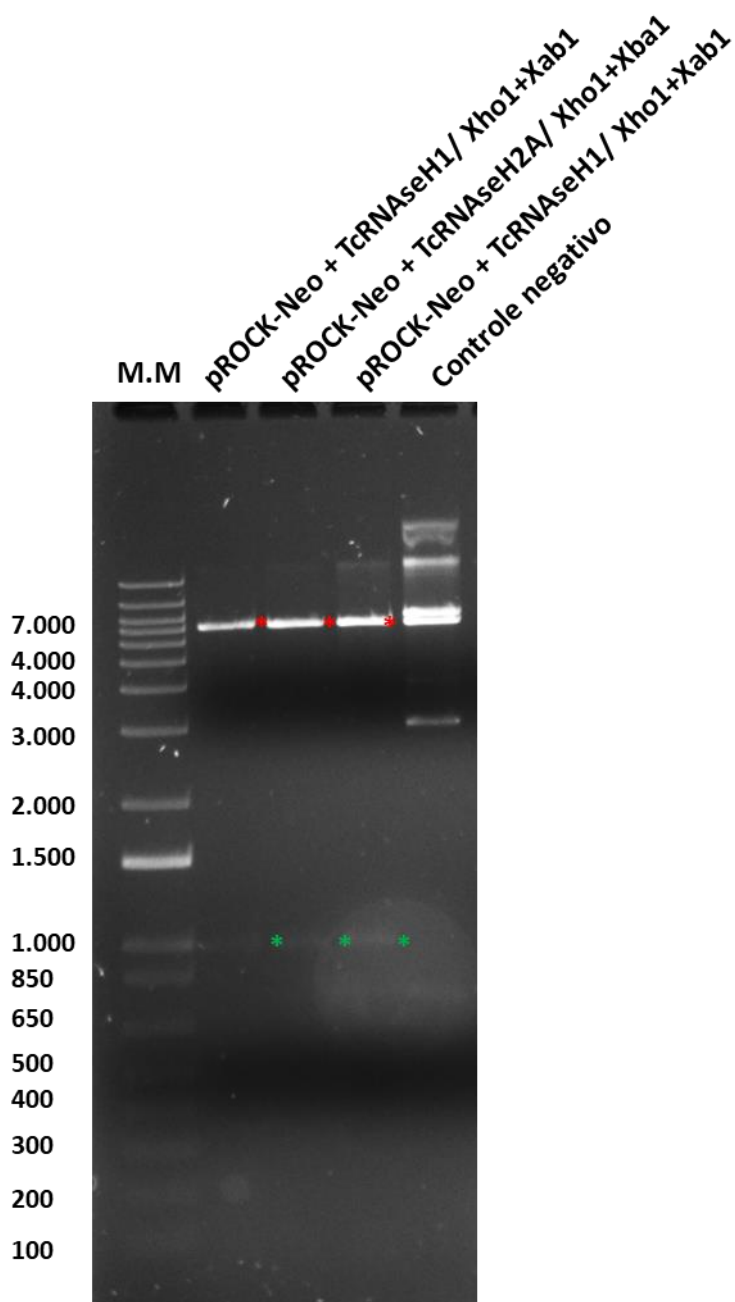


Figura 21 - Digestão enzimática dos plasmídeos pROCK-NEO+TcRNaseH1 e pROCK-NEO+TcRNaseH2A, respectivamente. Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio, demonstrando o resultado da digestão enzimática dos plasmídeos em análise selecionados por PCR de colônia positiva para o inserto. Legenda: **Coluna 1**) marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder; **Coluna 2**) produto da digestão dos plasmídeos extraídos da colônia 1 com resultado positivo para a PCR do gene TcRNaseH1 digerido com Xho1+Xba1, com bandas de 7.213pb e 972 pb; **Coluna 3**) produto da digestão dos plasmídeos extraídos da colônia 2 com resultado positivo para a PCR do gene TcRH2A, digerido com Xho1+Xba1, com bandas de 7.213pb e 975 pb; **Coluna 4**) produto da digestão dos plasmídeos extraídos da colônia 3 com resultado positivo para a PCR do gene TcRH1, digerido com Xho1+Xba1, com bandas de 7.213pb e 972 pb; **Coluna 5**) controle negativo (plasmídeo pROCK-Neo não digerido).

4.7. FENÓTIPO DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS SUPEREXPRESSORAS DOS GENES DA RNASEH1 E DA RNASEH2A DE *T. cruzi* EM RESPOSTA AO ESTRESSE GENOTÓXICO INDUZIDO POR UVC.

Conforme mencionado anteriormente, os nossos resultados demonstram que TcRPA pode ser uma importante mediadora das interlocuções entre as proteínas da DDR e o TC-NER e tem um papel relacionado a sobrevivência celular de *T. cruzi* após UV. Ademais, é proposto que a interação RPA-RNase H1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados ao *R-loop* e morte celular (NGUYEN, H, D. et al., 2017; BELOTSEKOVSKII, P. B. et al., 2018). Desse modo, buscamos elucidar o papel da superexpressão dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A na sinalização a danos ao DNA durante o início da transcrição em *T. cruzi* e seu possível papel na resolução de *R-loops*. Visto que, caso os híbridos DNA/RNA sejam formados, esses podem ser desfeitos pela ação dessas RNases que degradam a porção de RNA que interage com o DNA (SANTOS-PEREIRA, J. M. & AGUILERA, A, 2015).

Em *T. cruzi* os estudos sobre o papel de TcRNaseH1 e TcRNaseH2A tiveram início após a obtenção das linhagens superexpressoras de RNaseH1 e da RNaseH2A, conforme descrito nos itens anteriores. Assim, foi possível avaliar o fenótipo de sobrevivência da linhagem superexpressora do gene da RNaseH1 e da RNaseH2A, respectivamente, em resposta ao estresse genotóxico induzido por UVC. O resultado demonstrou que a superexpressão dos genes das RNaseH1 e RNaseH2A conferiu resistência à essas células, logo após a exposição à UV em comparação com a linhagem CL selvagem irradiada, em ambos casos (Tc RNaseH1 $p < 0,0001$ e TcRNaseH2A $p < 0,0001$, respectivamente), figura 22 e 24. Outro fenômeno observado ao acompanhar o crescimento das células das linhagens superexpressoras é que a superexpressão das TcRNase H1 e TcRNaseH2A influenciou o crescimento celular após exposição à UV, uma vez que células selvagens apresentam uma parada de crescimento transitória, por outro lado, as linhagens superexpressoras foram capazes de retomar o crescimento celular após 24 horas em níveis similares às células não irradiadas, figura 23 e 25.

A

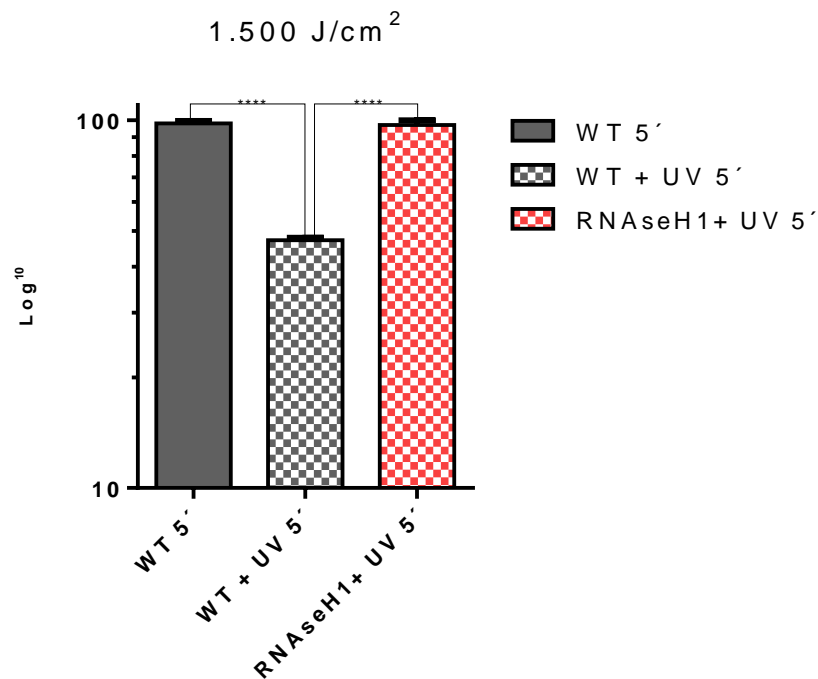


Figura 22 – Sobrevivência de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNAseH1 de *T. cruzi* expostas à UVC: A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas desafiadas com 1.500 J/cm² das linhagens selvagem cepa CL Brener (WT+UV – barra cinza quadriculado); superexpressora de TcRNAseH1 (TcRNAseH1+++ +UV - barra vermelho quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivência em Log¹⁰.

A

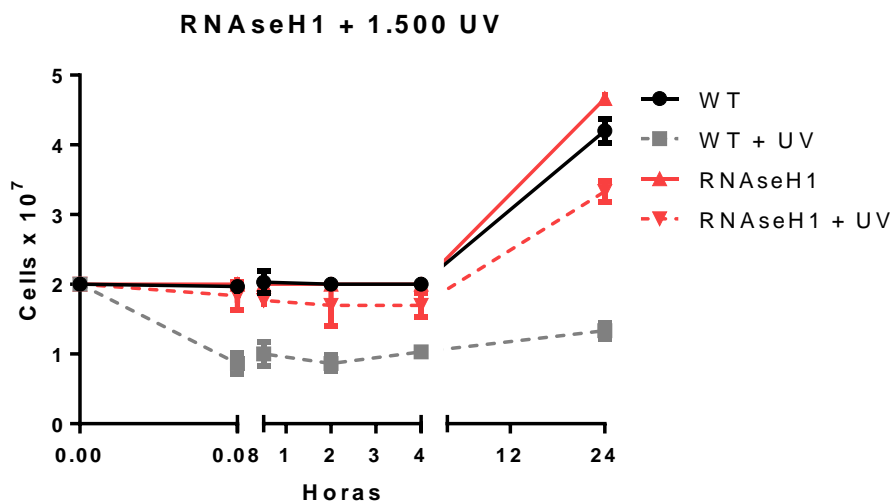


Figura 23 – Crescimento celular de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNAseH1 de *T. cruzi* expostas à UVC: A) Curva de crescimento de células epimastigotas desafiadas com 1.500 J/cm² das linhagens selvagem cepa CL Brener (WT+UV – linha cinza tracejado); superexpressora de TcRNAseH1 (TcRNAseH1 +++ +UV - linha vermelho tracejado). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5', 1, 2, 4 e 24 horas após irradiação UV. A linha contínua, em preto e vermelho representam as células controle não desafiadas com UV.

A

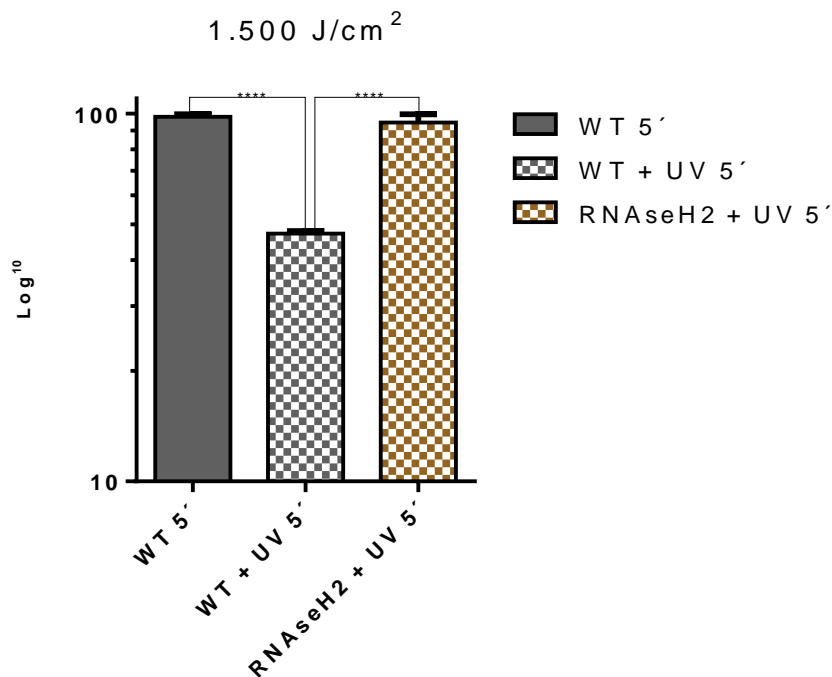


Figura 24 – Sobrevivência de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNaseH2A de *T. cruzi* expostas à UVC: A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas desafiadas com 1.500 J/cm² das linhagens selvagem cepa CL Brener (WT+UV – barra cinza quadriculado); superexpressora de TcRNaseH2A (TcRNaseH2A +++ +UV - barra marrom quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivência em Log¹⁰.

A

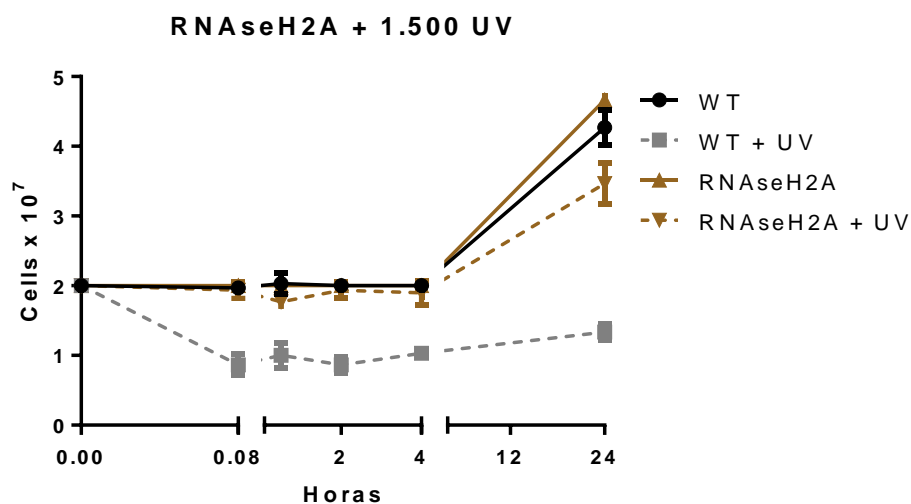


Figura 25 – Crescimento celular de células selvagem e linhagem superexpressora de TcRNaseH2A de *T. cruzi* expostas à UVC: A) Curva de crescimento de células epimastigotas desafiadas com 1.500 J/cm² das linhagens selvagem cepa CL Brener (WT+UV – linha cinza tracejado); superexpressora de TcRNaseH2A (TcRNaseH2A +++ +UV - linha marrom tracejado). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5', 1, 2, 4 e 24 horas após irradiação UV. A linha contínua, em preto e vermelho representam as células controle não desafiadas com UV.

4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA NA SINALIZAÇÃO DE MORTE APÓS O TRATAMENTO COM AGENTE GENOTÓXICO EM *T. cruzi*.

A via sinalização de resposta a danos ao DNA para o TC-NER inclui modificações pós-traducionais que ocorrem em proteínas, como RNAPol II e CSB. A modificação pós-traducional mais conhecida para a DDR do TC-NER é a ubiquitinação que pode determinar a atividade, a localização e interações de CSB com outras proteínas (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015; BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). Como descrito anteriormente por ZHANG, L. & GONG, F. (2016), a ubiquitinação de CSB pelo complexo CSA conduz à degradação proteassomal de CSB de um modo dependente de UV. Estabilizada após interação com UVSSA, que promove o recrutamento da enzima deubiquitinase USP7, levando à deubiquitinação de CSB prevenindo assim a sua degradação pelo proteassoma. Considerando os nossos resultados anteriores que denotam a importância de níveis adequados de TcCSB na célula e sua correlação com os fenótipos de sobrevivência e morte em *T. cruzi* após danos gerados por UV, buscamos avaliar a influência da inibição do sistema ubiquitina-proteassoma na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico em *T. cruzi*.

4.8.1 Identificação do suposto homólogo do gene USP7 em *T. cruzi*.

Para predição e identificação do suposto homólogo do gene que codifica a proteína USP7 (*Ubiquitin-Specific Peptidase 7*) de tripanossomatídeos utilizou-se a ferramenta de bioinformática *PSI-BLAST* que permitiu a identificação de um alelo conservado em *T. cruzi* (CL Brener), alelo 1: TcCLB.510761.70, CL-Brener *Esmeraldo-Like* e o alelo 2 foi predito como *pseudogenic_transcript*. O alelo 1 apresentou valor de identidade (37%) e similaridade (64%) quando comparados com a sequência da hUsp7. O valor de E atribuído ao alinhamento foi de 6×10^{-71} , o que revela a conservação entre as sequências comparadas.

Organismo	USP7
<i>Trypanosoma cruzi</i> - CL- Brener <i>Esmeraldo-Like</i>	TcCLB.510761.70
<i>Trypanosoma cruzi</i> - CL- Brener <i>Non-Esmeraldo-Like</i>	Pseudogene

Tabela 8: Supostos homólogos dos genes que codificam para a proteína USP7 (*Ubiquitin-Specific Peptidase 7*) em *T. cruzi*.

4.8.2 Domínios conservados na sequência da proteína hipotética conservada TC.CLB.510761.70 de *T. cruzi*.

Para identificar os domínios conservados presentes na sequência do homólogo da proteína Usp7 em *T. cruzi* (Tc.CLB.510761.70), utilizamos os softwares Pfam (FINN et al., 2016) e *Position Specific Iterated- BLAST (PSI-BLAST)*, (ALTSCHUL et al., 1990), considerando significativos os valores de $E < 10^{-7}$. A análise revelou a presença do domínio conservado *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (UCH)*, este domínio é um dos dois domínios C-terminais das proteases específicas de ubiquitina, em *T. cruzi* predito nas posições (145-472) com o valor de E de 6.5×10^{-48} da sequência analisada. O outro domínio predito foi *ICPO-binding domain of Ubiquitin-specific protease 7*, este em particular é encontrado para interagir com a proteína ICPO, descrito nas regiões (748-872), com valor de E de 6.2×10^{-08} . Por último descrevemos o domínio *Ubiquitin-specific protease C-terminal (USP7-C2)*, que confere a especificidade da Usp7 e seus atributos proteicos, predito na região (885-1152) da sequência analisada com valor de E de 3×10^{-13} , tabela 9. Portanto, os domínios aqui preditos para a sequência da suposta TcUsp7 são similares aos encontrados na hUsp7 o que pode indicar a possível função de TcUSP7 na deubiquitinação, exercendo uma atividade protease que catalisa a clivagem das ligações proteína-ubiquitina em *T. cruzi*. Ademais, os domínios preditos em *T. cruzi* UCH e USP7-C2 são possíveis de inibição com o composto PR-619 o qual demonstrou inibir substancialmente a atividade da protease específica da ubiquitina 7 através da inibição dos mesmos, conforme descrito por ALTUN, M., et al. 2011.

Família	Descrição	Classificação	Alinhamento		<i>E-value</i>
			Início	Fim	
UCH	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i>	Domínio	145	472	6.5 x 10 ⁴⁸
USP7 ICP0	<i>ICP0-binding domain of USP 7</i>	Domínio	748	872	6.2 x 10 ⁻⁰⁸
USP7-C2	<i>Ubiquitin-specific protease C-terminal</i>	Domínio	885	1172	3 x 10 ⁻¹³

Tabela 9: Domínios conservados identificados na sequência de aminoácidos da suposta USP7 de *T. cruzi* (cepa CL Brener - alelo *Esmeraldo-Like*), Tc.CLB.510761.70. Os aminoácidos correspondentes ao domínio conservado encontrado na sequência estão disponíveis na coluna (alinhamento).

4.8.3. A inibição da deubiquitinação influencia a resposta a UVC em *T. cruzi*.

Como descrito anteriormente por ZHANG, L. & GONG, F. (2016), a ubiquitinação de CSB pelo complexo CSA conduz à degradação proteossomal de CSB de um modo dependente de UV. Estabilizada após interação com UVSSA, que promove o recrutamento da enzima deubiquitinase USP7, levando à deubiquitinação de CSB prevenindo assim a sua degradação pelo proteassoma. Em *T. cruzi* a busca por homólogos de CSA não relatou a presença dessa proteína no parasito. Por outro lado, nossos dados predizem uma suposta proteína TcUsp7 - Tc.CLB.510761.70, nos levando a questionar o seu papel no TC-NER e DDR. Considerando as informações anteriores sobre a importância do mecanismo de deubiquitinação para o TC-NER, investigamos o fenótipo das linhagens selvagem e TcCSB +/- sob o efeito da inibição da deubiquitinação. Para isso, as culturas foram pré-tratadas com PR-619, um inibidor reversível de DUB, dentre essas a USP7 (inibição de 60%), que é permeável às células e induz o acúmulo de proteínas poliubiquitinadas, sem afetar diretamente a atividade do proteassoma (ALTUN, M. et al., 2011). Na figura 26, podemos ver a resposta a diferentes doses do composto PR-619 quando o mesmo foi mantido todo o tempo no meio de cultura. A dose maior (40uM) provocou uma morte rápida do parasito, enquanto as doses menores (10uM e 20 uM) não provocam uma morte imediata, mas tem efeito após seis horas em contato com as células. Como iríamos expor às células por 30 minutos na presença da droga, nós selecionamos a concentração de 20 uM para prosseguir com os experimentos.

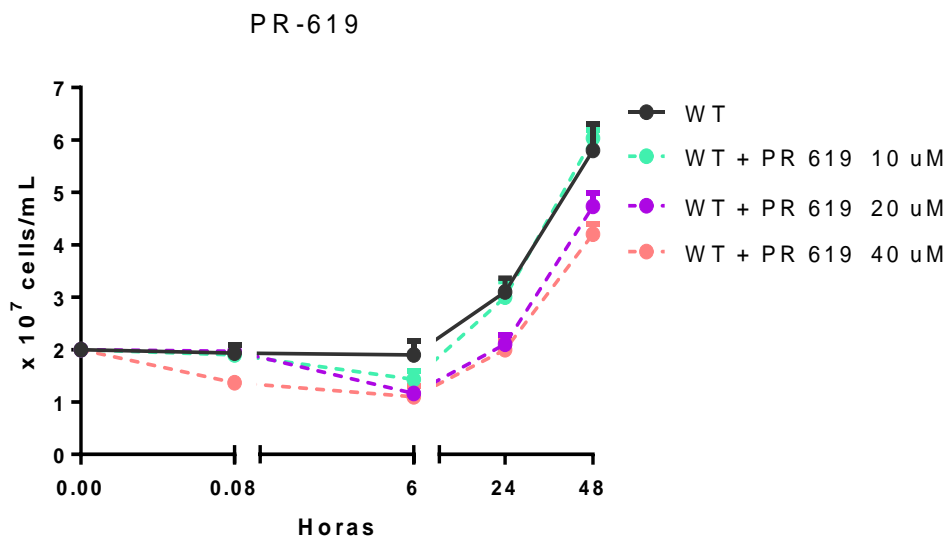


Figura 26 - Curva dose-resposta do crescimento celular das células tratadas com PR619: A) Crescimento celular do tipo selvagem controle (WT) e tratadas com PR-619 nas concentrações: 10uM, 20 uM e 30 uM. A droga foi mantida no meio LIT e o crescimento acompanhado. As células foram contadas em câmara citométrica nos períodos indicados (5', 6, 24, 48 horas). Experimento realizado em triplicata.

Desse modo, as células foram pré-tratadas com PR-619 (20 uM por 30 minutos) para a inibição de TcUS7 e desafiadas com irradiação UV (1.500 J/cm²) e sua sobrevivência determinada e o crescimento acompanhado. O gráfico de sobrevivência demonstra que, na ausência da deubiquitinação, as células selvagens pré-tratadas com PR-619 são significativamente mais resistentes à UV que as células selvagens não tratadas e desafiadas ($p < 0,0001$), fenótipo observado logo após a exposição à UVC (5'), figura 27. Ou seja, a não ação de deubiquitinação nos alvos das DUBs inibidas por PR-619 relaciona-se com o fenótipo de sobrevivência imediata à exposição UVC. Nesse contexto, a inibição da suposta TcUSP7 induziria a poli-ubiquitinação de TcCSB e o fenótipo aqui observado poderia ser relacionado à ausência de CSB que após poli-ubiquitinado é degradado, abstendo a célula do sinal de CSB para a DDR. Nesse caso, mimetizando o fenótipo da linhagem heminocaute de TcCSB. Outra evidência que colabora com o observado é que células TcCSB^{+/-} quando expostas à UVC apresentam o mesmo fenótipo de resistência imediata, possivelmente pelo mesmo motivo, ausência de CSB para o TC-NER e sinalização de morte após UV.

A

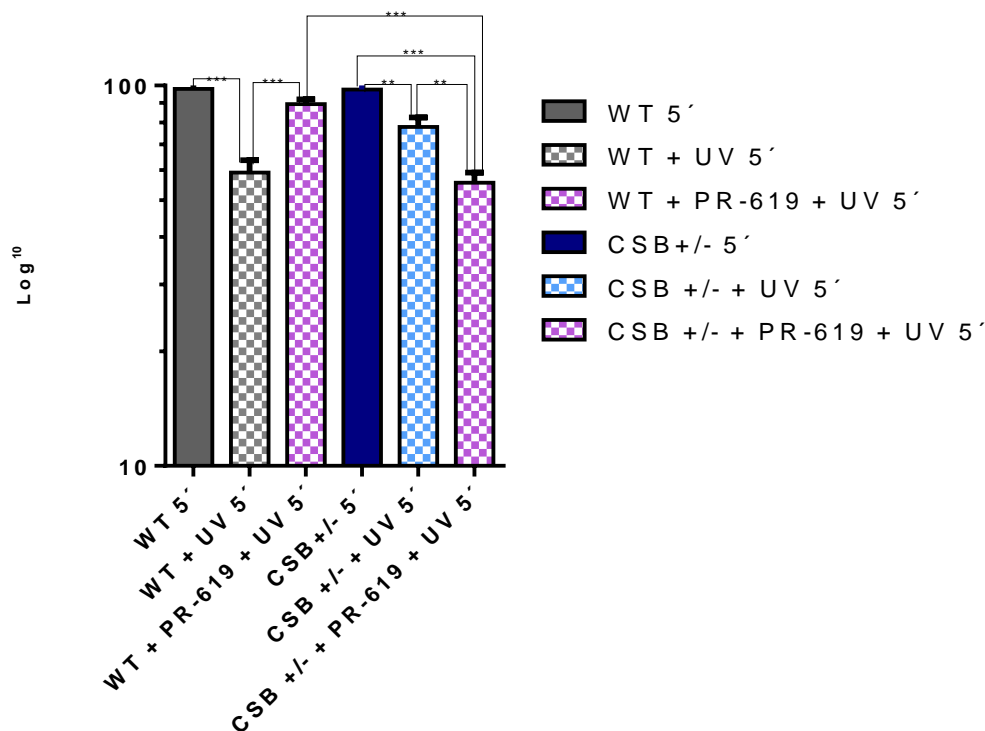


Figura 27 - Sobrevivência celular em células selvagem pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV:
A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - barra cinza) e tratadas com 1.500 J/cm² (WT + UV – barra cinza quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade de USP7 as células foram pré-tratadas com PR-619 (20uM por 30 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (WT+PR-619+UV – barra lilás quadriculado). A sobrevivência foi determinada para as linhagens selvagem controle e desafiadas com UV e também sob o efeito da inibição de USP7. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰. **Sobrevivência celular em células heminocaute de TcCSB pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV:** Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo CL Brener heminocaute de TcCSB (TcCSB+/- - barra azul escuro) e tratadas com 1.500 J/cm² (CSB+/- + UV – barra azul claro quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade USP7 as células foram pré-tratadas com PR-619 (20uM por 30 min). Em seguida, as células CSB+/- foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (CSB+/- + pr-619 + UV - barra lilás quadriculado). A sobrevivência foi determinada para a linhagem CSB+/- controle e desafiadas com UV e também sob o efeito da inibição da USP7. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰.

No entanto, apesar das células selvagens apresentarem uma resistência imediata sob o efeito da deubiquitinação, o oposto foi visto para a linhagem TcCSB+/-, conforme visto na figura 27, pois essas foram significativamente mais sensíveis do que as células

TcCSB^{+/-} não tratadas com PR-619 ($p < 0,002$) e desafiadas com UV. Outra evidência importante dos dados é que ao acompanhar o crescimento das células selvagens tratadas com PR-619 foi possível observar que a inibição da deubiquitinação induz a parada do crescimento celular durante as horas analisadas, o mesmo é observado nas células pré-tratadas com PR-619 e desafiadas com UV, figura 28. O crescimento das células TcCSB^{+/-} tratadas com PR-619 também foi inibido. No entanto, em células TcCSB^{+/-} tratadas com PR-619 e expostas à luz UVC a porção de células sobreviventes voltam a crescer após 24 horas o que não é visto nas células CSB^{+/-} após a exposição a luz UVC (figura 28).

A

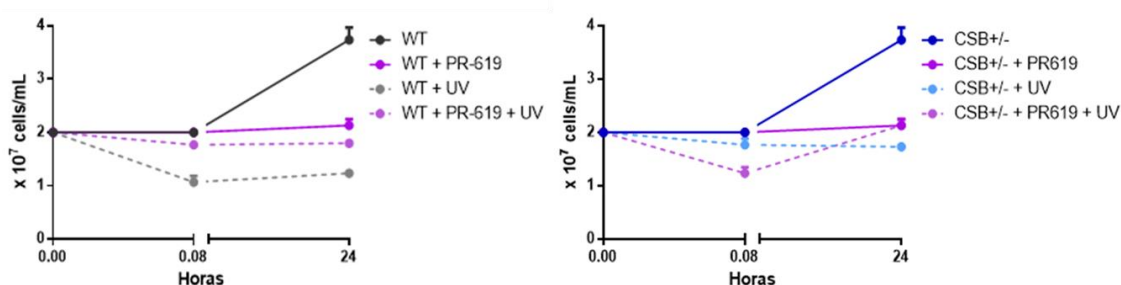


Figura 28 - Crescimento celular em células selvagem pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV: A) Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - linha preta) e tratadas com 1.500 J/cm^2 (WT + UV – linha cinza tracejado). Para a inibição da atividade da USP7 as células foram pré-tratadas com PR-619 (20 μM por 30 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm^2 (WT + PR-619 + UV – linha lilás tracejada) e controle pré-tratado, não desafiado com UV (WT+PR-619 – linha roxo). O crescimento foi acompanhado nos tempos: 5´ e 24h após irradiação UV. **Crescimento celular em células heminocaute de TcCSB pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV:** Curva de crescimento celular de epimastigotas do tipo CL Brener heminocaute de TcCSB (TcCSB^{+/-} - linha azul escuro) e tratadas com 1.500 J/cm^2 (CSB^{+/-} + UV – linha azul claro tracejado). Para a inibição da atividade de USP7 as células foram pré-tratadas com PR-619 (20 μM por 30 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm^2 (CSB^{+/-} + PR-619 + UV – linha lilás tracejada) e controle pré-tratado, não desafiado com UV (CSB^{+/-} + PR-619 – linha roxo). O crescimento foi acompanhado nos tempos 5´ e 24h após irradiação UV

4.8.4 A inibição do proteossoma não influencia a resposta UVC em *T. cruzi*

Para descrever o fenótipo das linhagens celulares estudadas sob o efeito da inibição da atividade proteossomal, quando expostas a UVC, a cultura selvagem e TcCSB^{+/-} foram pré-tratadas com MG132 (SML1135, Sigma-Aldrich, USA), um potente inibidor do proteossoma permeável à membrana e de ação reversível, na concentração de 50 μM por 30 min, como descrito por CARDOSO J, L., et al., 2011.

Desse modo, as células foram pré-tratadas com 50 μM de PR-619 e desafiadas com UVC 1.500 J/cm^2 e sua sobrevivência determinada e o crescimento acompanhado. O gráfico (figura 29) demonstra que na ausência da atividade proteassomal a porcentagem de sobrevivência das células da linhagem selvagem não às distinguem ($p>0,09$). Esse fenótipo é observado no tempo 5', sugerindo que não haja relação da atividade proteassomal e a morte imediata, aqui relatada. Nesse trabalho, ao descrever o efeito da inibição da atividade do proteassoma, na linhagem TcCSB+/- pré-tratada com MG132 e exposta a UVC, observamos que o fenótipo não distingue significativamente do grupo TcCSB+/- (não tratado, $p>0,1$), logo após a exposição a UVC, tempo 5', como mostra o gráfico de sobrevivência (figura 29), similar a linhagem selvagem. O que sugere a não influência da atividade proteassomal sobre a sinalização de morte, logo após UVC.

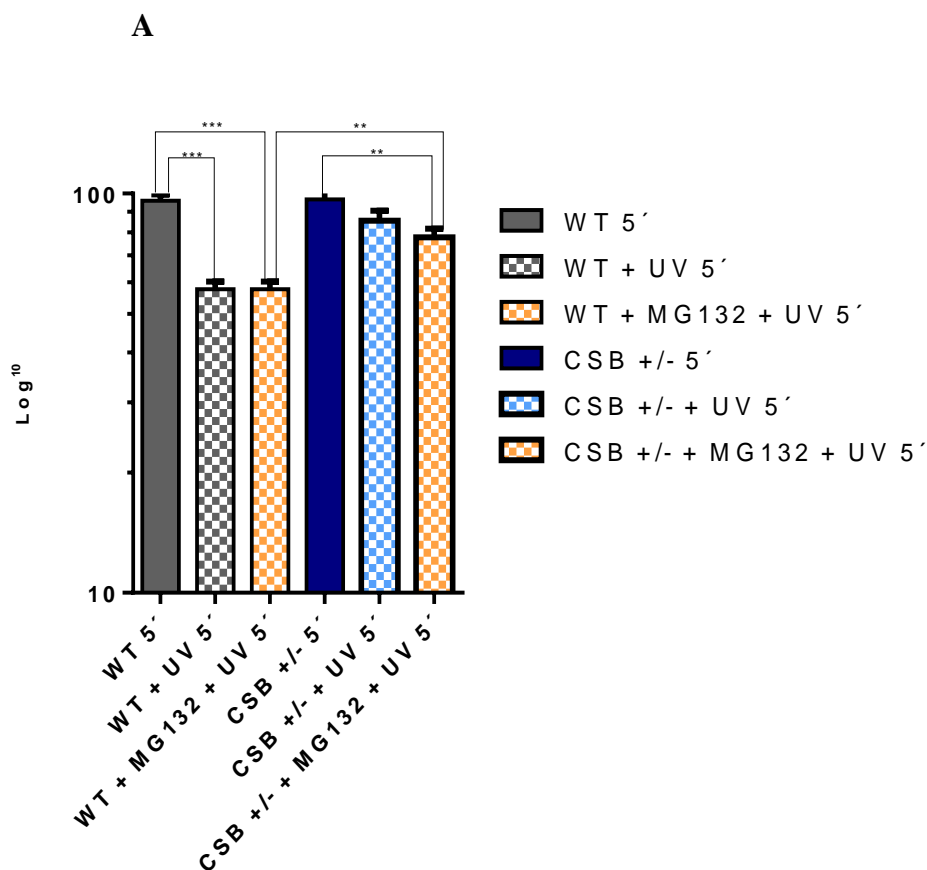


Figura 29: A) Sobrevivência celular em células selvagem pré-tratadas com MG132 e expostas à UV e crescimento celular: A) Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo selvagem CL Brener controle (WT - barra cinza) e tratadas com 1.500 J/cm^2 (WT + UV – barra cinza quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade do proteassoma as células foram pré-tratadas com MG-132 (50 μM por 30 min). Em seguida, as células foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm^2 (WT+MG-132+UV – barra laranja quadriculado). A sobrevivência foi determinada para as linhagens selvagem controle e desafiadas com UV e também sob o efeito da inibição de MG-132. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰.

Sobrevivência celular em células heminocaute de TcCSB pré-tratadas com PR-619 e expostas à UV. Taxa de sobrevivência de células epimastigotas do tipo CL Brener heminocaute de TcCSB (TcCSB+/- - barra azul escuro) e tratadas com 1.500 J/cm² (CSB+/- + UV - barra azul claro quadriculado). O percentual de sobrevivência foi calculado em relação às respectivas culturas controle não tratadas. Para a inibição da atividade do proteossoma as células foram pré-tratadas com MG-132 (50uM por 30 min). Em seguida, as células CSB+/- foram lavadas e expostas a 1.500 J/cm² (CSB+/- + MG132+ UV - barra laranja quadriculado). A sobrevivência foi determinada para a linhagem CSB+/- controle e desafiadas com UV e também sob o efeito da inibição de MG-132. Resultados representativos de três experimentos independentes. As barras representam o desvio padrão. Porcentagem de sobrevivencia em Log¹⁰.

4.9 OBTENÇÃO DO ANTICORPO: ANTI-TcCSB

4.9.1 Expressão heteróloga de TcCSB

Considerando os resultados obtidos e as evidências das relações proteína-proteína responsáveis para a sinalização celular de resposta a danos ao DNA frente ao estresse transcricional que definem a sinalização de apoptose e parada de crescimento celular, nós questionamos como a proteína TcCSB opera nesse cenário em *T. cruzi*. Assim, propusemos a obtenção do anticorpo anti-TcCSB para os estudos dessa proteína. O plasmídeo BL21 pRARE+TcCSB de *E. coli* produzido pela Dra. Karla de Andrade Oliveira foi sequenciado, traduzido em aminoácidos pelo ExPASy e analisado pelo software *Open Reading Frame Finder* para a identificação e confirmação da presença de parte TcCSB em fase correta de leitura, figura 30.

A

Translate Tool

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the "Methionine" or one of the highlighted residues following a Stop codon (or the beginning of the sequence).

This will create a virtual Swiss-Prot entry, comprising the residues from your chosen start position up to the following Stop codon.

```
F V Stop L Stop E G D I P W A I I Q H H E N L Y F Q G H M A S I Y N R L L E H Q R D G I K W L L R P H T Q R M G G I L S D E M G L G K T I Q V A S M L N A L H H S Q
Q L R D P C L I V S P L T V L R Q W V A E M H R W A P Y I R T C V M H E S S A T N M S R E K L I Q S I R S T P A V L L T T Y A A V R Q H C H L L H T A R F Q Y V I L D E
G H K I S N P E A T V T L A A K S F P T P H R L I L S G T P I Q N T L K E L W C L F D F V R P G L L G T M T K F V E E F E E P I N A S K D V R A S P L A L A T A V E C A
Q A L R E R I A P Y L L R R L K R Q V M S D A L P Q K Y E R V I R C P L S D D Q L E A Y V E L L T P S R V Q R L L S S T L T S P Q L M G G L N C D G R D A N G C L H I
A G I R F Q L F Q R Q Y H G G I R L E A F R V L N E L R Q I C N H V D I F R L R R A A K E N G A E Y F D D E E E D E T D G V D G K K K R R R G S H M S L R S N R L
V N Y S G S G K L Q T L Q K L L T V W Q R G G Q R V L V F S Q T R M A L D I I E N M C E Q E G F K Y I R M D G S T S G H H R Q E L M D R F N E D D S I V A A L L T T
R V G G V G V N L V G A N R V V L F D P D W N P V T D E Q A R E R A W R I G Q T R D V G V Y Stop E F E L R R Q A C G R T R A P P P P L R S G C Stop Q S P
```

Figura 30 – Representação gráfica da sequência de aminoácidos constituinte da porção expressa de TcCSB: Identificação da janela aberta de leitura para a porção de TcCSB à ser expressa. Os aminoácidos que constituem a ORF estão marcados em vermelho. Em azul estão os aminoácidos que constituem a sequência TEV (*Protease Clivage Site*) onde se observa a montante 2 histidinas (HH) parte da cauda His-Tag incompleta. Sequência clonada em plasmídeo pRARE+TcCSB.

Após confirmação da sequência, a expressão heteróloga de parte da proteína TcCSB foi obtida nas condições descritas em material e métodos. Conforme o resultado na figura 31, a proteína em estudo foi expressa após indução com IPTG em 0,5M e observamos a banda de interesse com o peso molecular esperado de 61kDa em extrato total. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE).

A

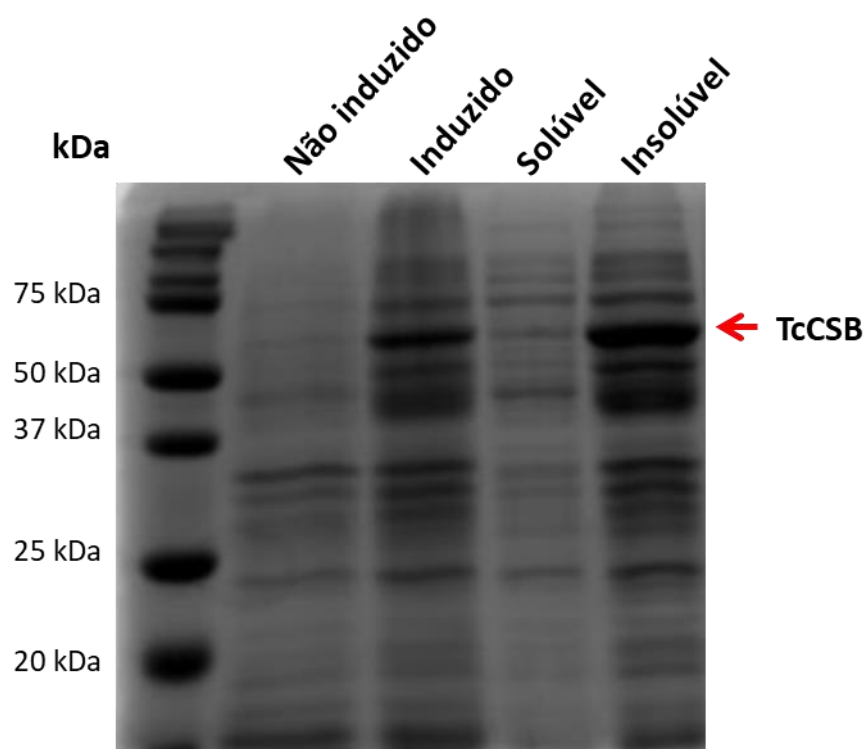


Figura 31 - Expressão heteróloga de parte da proteína TcCSB visualizada em gel SDS-PAGE: A) Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para visualização da expressão heteróloga da proteína de interesse (CSB 61 kDa) em BL21 pRARE+TcCSB à 30 °C com 0,5 mM de IPTG por 16h; Colunas, da esquerda para a direita: coluna 1 – marcador de peso molecular, *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*; coluna 2 – extrato total de células sem IPTG (não induzido); coluna 3 – extrato total de células com IPTG (induzido); coluna 4: proteínas em fração solúvel do extrato total de células induzidas com IPTG (solúvel); coluna 5: proteínas em fração insolúvel do extrato total de células induzidas com IPTG (insolúvel); Coloração: *Comassie Blue*.

Após a confirmação da presença da banda de interesse induzida por IPTG, realizamos a análise de espectrometria de massa a fim de confirmar se a expressão heteróloga confere com a parte da proteína TcCSB, permitindo assim o uso dela para a etapa de imunização.

4.9.2 Identificação da proteína TcCSB por espectrometria de massa.

Como descrito anteriormente, a fração de membrana de três replicatas biológicas independentes foram recortadas do gel SDS/PAGE para a banda de interesse (TcCSB) e os controles positivo (albumina) e negativo (porção do gel SDS/PAGE sem amostra), figura 32. Essas foram submetidas à dessalinização e concentração dos peptídeos para análise por espectrometria de massa. As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Proteômica – CELAM do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

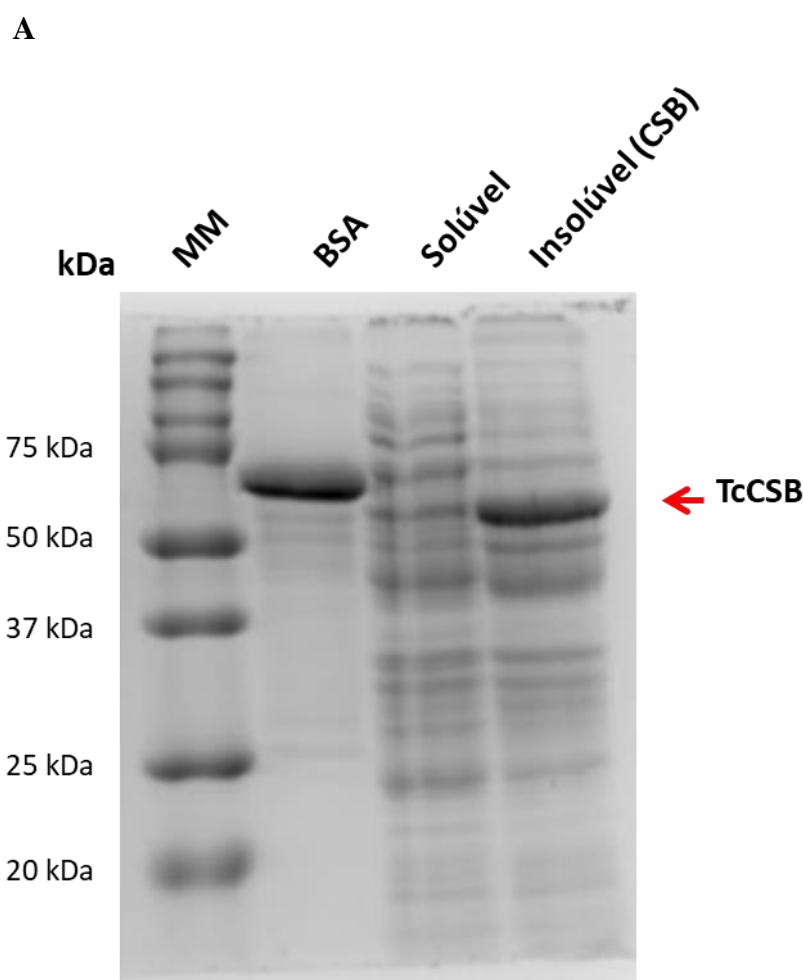


Figura 32 - SDS-PAGE para separação e visualização das bandas das proteínas BSA e TcCSB utilizadas para análise por espectrometria de massa: A) Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para visualização da expressão heteróloga da proteína de interesse (61 kDa) e do controle positivo albumina (BSA 66kDa). As bandas foram recortadas e preparadas para o sequenciamento por MS/MS. Colunas, da esquerda para a direita: coluna 1 – marcador de peso molecular, *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*; coluna 2 – proteína albumina (BSA); coluna 3 – proteínas em fração solúvel do extrato total de células induzidas com IPTG (solúvel); coluna 4: proteínas em fração insolúvel do extrato total de células induzidas com IPTG (insolúvel), contendo a proteína expressa CSB; Coloração: *Comassie Blue*.

Os dados brutos para a identificação das proteínas foram obtidos no MALDI-TOF/TOF Autoflex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). As moléculas desorvidas e ionizadas submetidas a vácuo, foram separadas em função da relação massa/carga. O tempo (tempo de voo) que a amostra leva para percorrer a distância entre a placa e o detector é proporcional à massa molecular, de forma que as moléculas menores chegam mais rápido ao detector. Há uma transdução de sinal e o espectro de massas é gerado de acordo com a massa das moléculas que estão presentes na amostra. O resultado do espectro de massa (MS/MS) obtido para o controle (albumina) está representado na figura 33. O espectro de massa obtido para a amostra teste (TcCSB) está representado na figura 34.

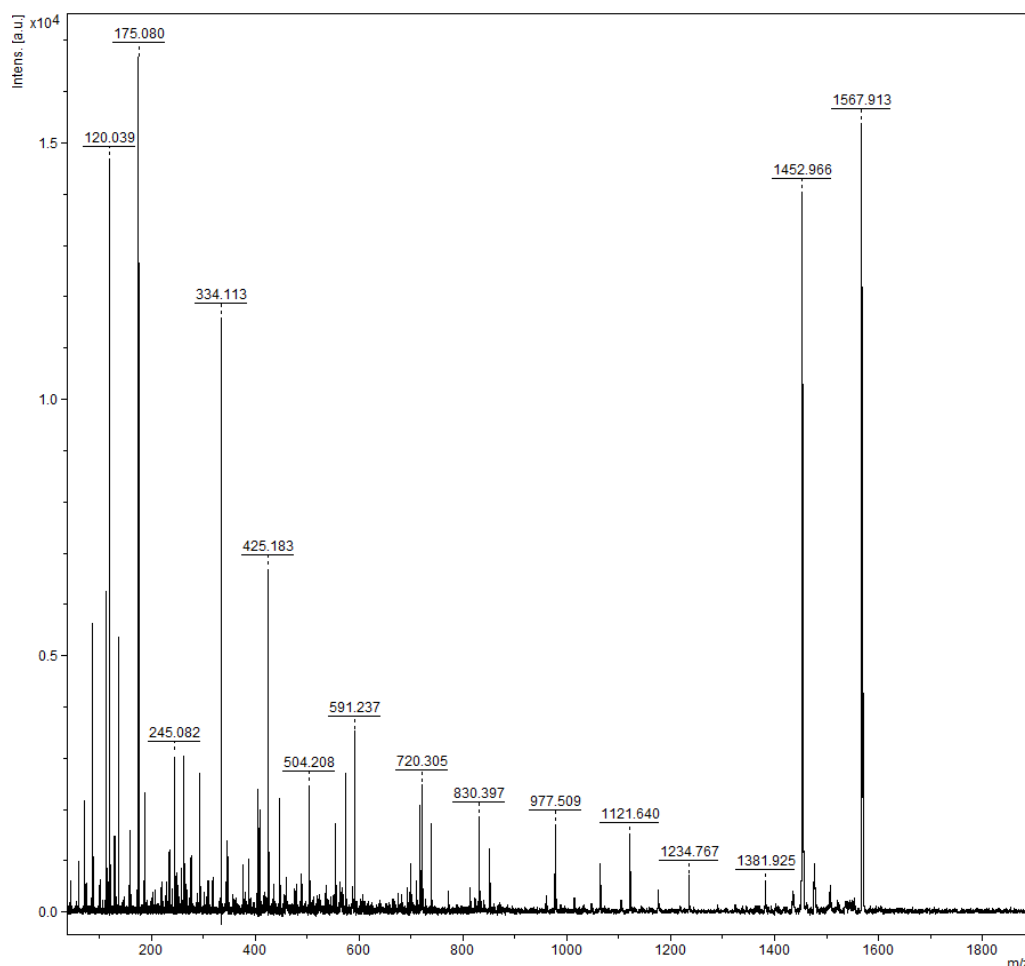
A

Figura 33 - Espectro de massa da amostra controle positivo BSA por MS/MS. A) Espectro de massa gerado para amostra BSA: o eixo X representa a relação massa/carga (Dalton) da proteína encontrada e o eixo Y representa intensidade relativa. Os números acima de cada pico representam a massa de cada analito encontrado na faixa de 200 a 1.800 m/z

Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo todas as impressões digitais das moléculas. Os dados obtidos foram armazenados e levados para o software Bruker Daltonics BioTools 3.3™, onde foi realizada a pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix Science, USA – <http://www.matrixscience.com>). Apenas proteínas com valores de score $P \leq 0,05$ foram consideradas na identificação. A pontuação dos íons é $-10 \cdot \log(P)$, onde P é a probabilidade de que a correspondência observada seja um evento aleatório. Pontuações de íons individuais >74 indicam identidade ou homologia extensa ($p < 0,05$).

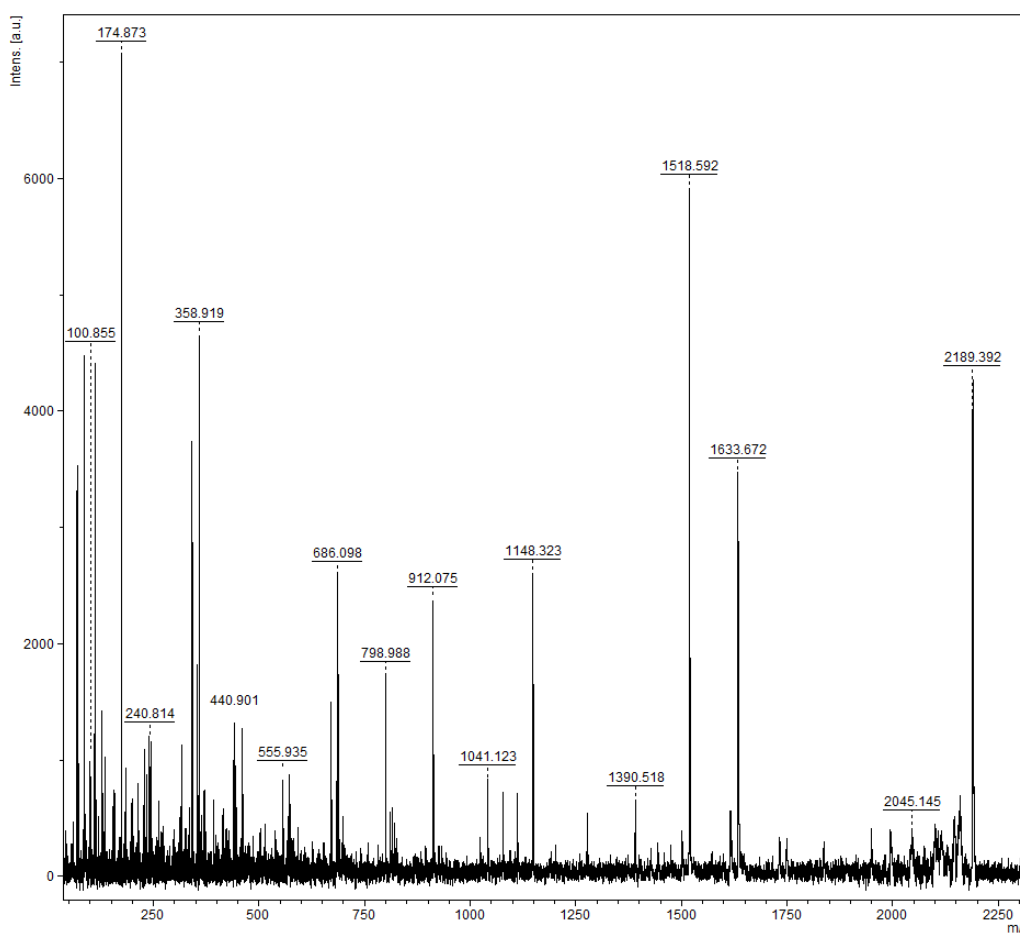
A

Figura 34 - Espectro de massa da amostra teste para TcCSB por MS/MS. A) Espectro de massa gerado para amostra TcCSB: o eixo X representa a relação massa/carga (Dalton) da proteína encontrada e o eixo Y representa intensidade relativa. Os números acima de cada pico representam a massa de cada analito encontrado na faixa de 200 a 2.250 m/z.

O resultado da pesquisa identificou a presença da proteína albumina para as amostras do controle positivo, conforme descrito na figura 35. As sequências resgatadas (*Protein hits*) de ALBU_BOVIN: *Serum albumin* de *Bos taurus* com *score* de 217 e ALBU_FELCA: *Serum albumin* de *Felis catus* com *score* de 93 confirmam a identificação da amostra BSA por MS/MS, conforme o histograma na figura 35. Esses resultados podem ser acessados pelo link: http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/20190516/FTeASfeeT.dat%20CP#Hit1.

A



Mascot Score Histogram

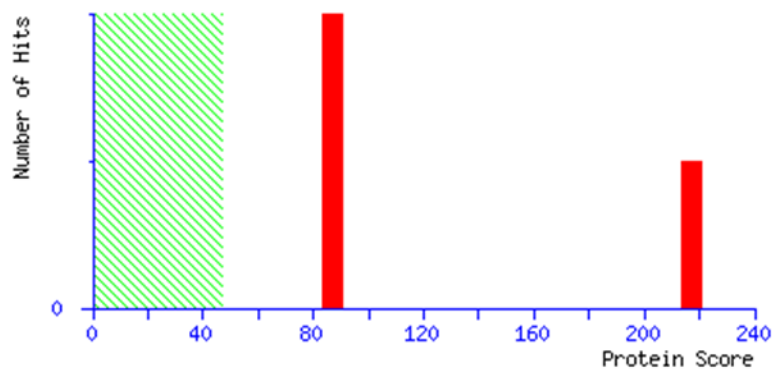


Figura 35 - Resultado da análise de identificação de proteínas no banco de dados MASCOT. A) Identificação de proteína controle (BSA) por MS/MS analisada por pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix Science USA). *Score* $P \leq 0,05$ foi considerado na identificação. O resultado da pesquisa identificou a presença da proteína albumina ALBU_BOVIN: *Serum albumin* de *Bos taurus* com *score* de 217 e ALBU_FELCA: *Serum albumin* de *Felis catus* com *score* de 93.

O resultado de identificação da amostra referente à proteína de estudo no banco de dados MASCOT (Matrix Science, USA) foi realizada seguindo os parâmetros de identidade e homologia descritos anteriormente para *score* $P \leq 0,05$. A sequência resgatada (*Protein hits*), figura 36, EKF28002.1: *DNA excision repair protein, putative SNF2 family helicase-like protein, putative, partial* de *Trypanosoma cruzi* com *score* de

106 e identificada pelos peptídeos VVLFDPDWNPVVTDEQAR confirma a identificação de TcCSB por MS/MS, conforme o histograma na figura 36. Assim, confirmando que a expressão heteróloga confere-se à TcCSB de *T. cruzi*. Esses resultados podem ser acessados pelo link: http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20190516/FTeASfemS.dat%20CO%200,5%20NCBI#Hit2

A

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : Adriana
 Email : ufmg.lmprot@gmail.com
 Search title : 1
 MS data file : DATA.TXT
 Database : NCBIprot 20180429 (152462470 sequences; 55858910152 residues)
 Taxonomy : Eukaryota (eucaryotes) (33321343 sequences)
 Timestamp : 16 May 2019 at 19:31:37 GMT
 Protein hits : [EKF28002.1](#) DNA excision repair protein, putative, SNF2 family helicase-like protein, putative, partial [Trypanosoma cruzi]

Mascot Score Histogram

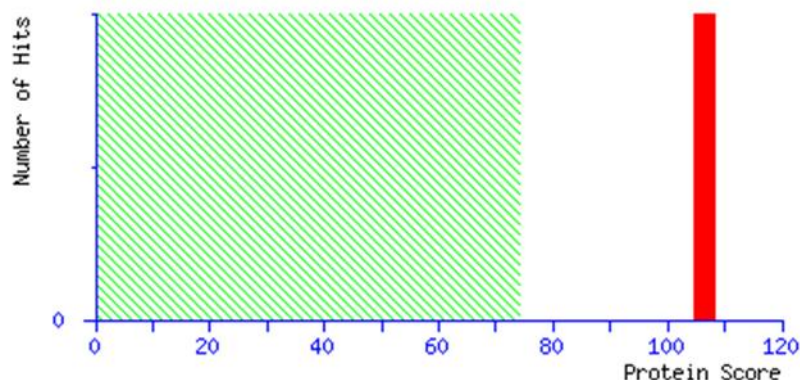


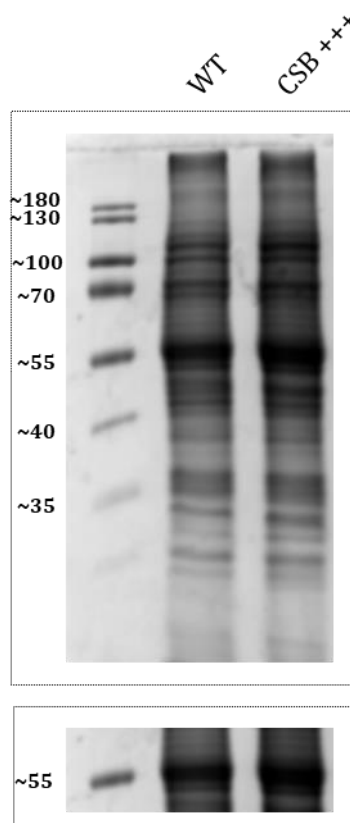
Figura 36 - Resultado da análise de identificação de proteína no banco de dados MASCOT. A) Identificação de proteína por MS/MS analisada por pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix Science USA). $Score P \leq 0,05$ foi considerado na identificação. A sequência resgatada (*Protein hits*) EKF28002.1: *DNA excision repair protein, putative SNF2 family helicase-like protein, putative, partial* de *Trypanosoma cruzi* com score de 106 confirma a presença da proteína em estudo, TcCSB.

4.10 WESTERN BLOT

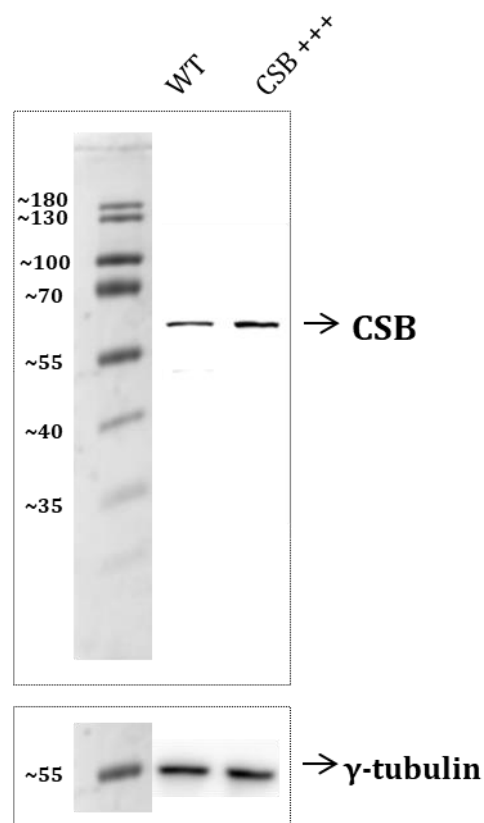
Após a obtenção do soro anti-TcCSB utilizamos a técnica de *Western Blot* para a validação da reatividade contra a proteína TcCSB no extrato total de *T. cruzi* e para a determinação dos níveis de TcCSB nas células estudadas. Após a obtenção do extrato total de proteínas, esse foi lisado, sonificado e quantificado como descrito em material e métodos. Para a separação das proteínas em gel utilizamos o protocolo de eletroforese

SDS-PAGE. Em seguida a etapa de *blotting* a membrana foi bloqueada e incubada com o soro/anticorpo primário anti-TcCSB (diluição 1/5.000 e 3% BSA) e secundário. A membrana foi revelada e o resultado confirma a especificidade do soro/anticorpo anti CSB para *Western blot* onde se observa uma banda de 61 kD conforme esperado para TcCSB no extrato proteico total de *T. cruzi*, figura 37. A quantificação do nível da proteína TcCSB em extrato total foi calculado e normalizado a partir do nível do controle de carregamento α -tubulina utilizando o software Image J. O nível de expressão relativa da proteína CSB foi medido e a proteína CSB foi 0,5 vezes mais expressa em células com superexpressão de CSB do que em células do tipo selvagem, conforme figura 37C.

A



B



C

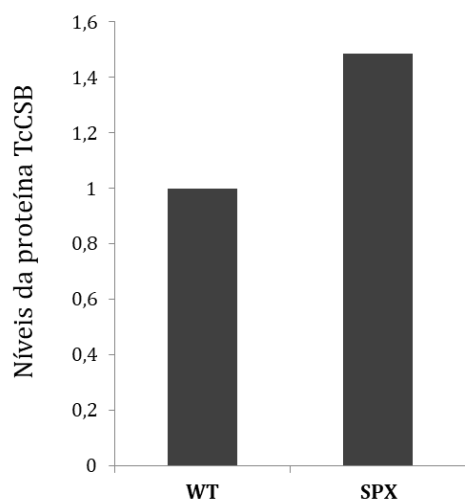


Figura 37 - Western Blot anti-TcCSB em extrato total das linhagens selvagem e superexpressora e quantificação dos níveis de TcCSB: A) Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para visualização e separação de proteínas do extrato total das linhagens selvagem (coluna 2) e superexpressora de TcCSB (coluna 3) observa-se a integridade do extrato.: coluna 1 – marcador de peso molecular: *PageRule*; *Prestained Protein Ladder*; Coloração: *Comassie Blue*. B) Membrana representativa do *Western blot* para a quantificação do nível de TcCSB (61kDa) nas linhagens estudadas (anticorpo anti-TcCSB) selvagem (coluna 2) e superexpressora de TcCSB (coluna 3). Coluna 1 – marcador de peso molecular: *PageRule*; *Prestained Protein Ladder*. Quadrante inferior: Membrana representativa do *Western blot* para detecção dos níveis de α -tubulina, utilizado como controle de carregamento. MW: *PageRule*; *Prestained Protein Ladder*. C) Quantificação do nível de TcCSB na linhagem selvagem (WT) e superexpressora (SPX). A concentração de proteína em bandas de gel SDS-PAGE foi determinada usando o software ImageJ.

4.11 CINÉTICA DA PROTEÍNA TcCSB APÓS IRRADIAÇÃO UVC POR IMUNOFLUORESCÊNCIA EM *T. cruzi*.

Com o objetivo de descrever a localização celular da proteína TcCSB e sua cinética em análise de curso de tempo após tratamento com UV-C, realizamos a técnica de imunofluorescência em linhagens controle e tratadas com 500 J/cm^2 . Nos tempos de 30', 2h, 4h e 24h após irradiação as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-TcCSB / secundário IgG *anti-mouse Alexa Fluor*® 488. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com *Hoechst 3342*. O resultado da imunolocalização da proteína CSB em *T. cruzi* após UV (células selvagem - WT) foi observada nos tempos 30', 2, 4, e 24 horas. Os resultados demonstram que na linhagem selvagem a proteína CSB após 30 min da irradiação UV-C, é encontrada em pequenos *foci* granulares com localização perinuclear (figura 38). A presença da proteína TcCSB também é observada no kDNA também na forma de pequenos *foci* granulares, assim, surgem novas hipóteses sobre as funções de TcCSB para o TC-NER no DNA mitocondrial. Após 2 e 4 horas da

irradiação UV, a proteína TcCSB é encontrada em *foci* granulares citoplasmáticos indicando uma migração da proteína do núcleo ao citoplasma. Essas estruturas granulares contendo CSB não são mais observadas 24 horas após irradiação em células selvagem, figura 38.

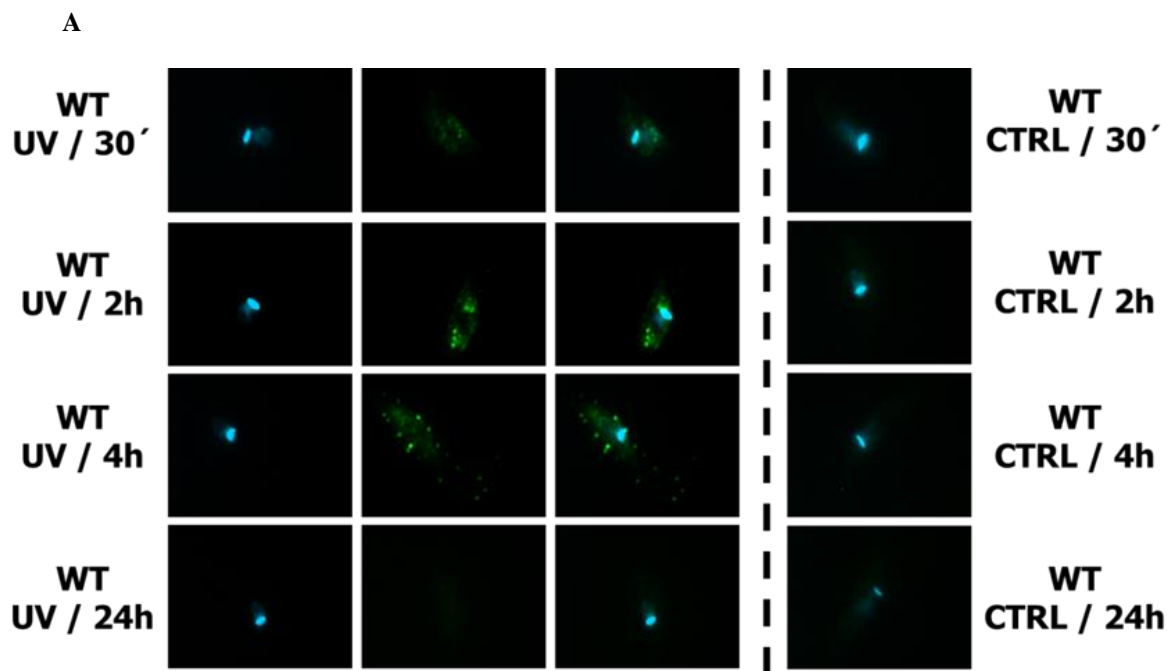


Figura 38 - Imunolocalização de CSB após irradiação UV-C na linhagem selvagem de *T. cruzi*. A) Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagem selvagem (CL Brener – WT). Painel à direita da linha tracejada: células controle não irradiadas. Painel à esquerda da linha tracejada: células irradiadas com 500 J/cm² de UV-C em análise de curso de tempo após tratamento, 30 min, 2, 4 e 24 horas. A detecção de TcCSB foi realizada com o anticorpo primário anti-CSB e secundário anti-mouse IgG de cabra conjugado com o Alexa Fluor 488. A coloração do DNA nuclear e do cinetoplasto (DAPI) foi realizada com o Hoechst 33342.

Em *T. cruzi*, nossos resultados demonstram que a dose de 500 J/cm² não letal foi capaz de induzir o recrutamento de CSB ao núcleo e kDNA e também descrevemos sua presença em estruturas granulares. Essa análise foi realizada entre as linhagens de estudo de TcCSB selvagem, superexpressora e heminocaute e os nossos resultados revelam que o número de *foci* contendo TcCSB relaciona-se com os níveis da proteína na célula. Essas evidências podem ser observadas ao compararmos as linhagens selvagem, superexpressora e heminocaute de TcCSB, onde após 30 min da irradiação UV a quantidade de *foci* granulares em torno do núcleo e kDNA é maior em células superexpressora de TcCSB do que em células do tipo selvagem. Na linhagem superexpressora há também formação de pequenos grânulos próximos aos flagelos.

Assim, demonstramos que o excesso da proteína TcCSB relaciona-se com a maior formação dessas estruturas granulares que ocorre após a irradiação UV-C o que é o oposto para as células heminocaute de TcCSB onde o número desses *foci* após 30 min da irradiação UV-C são reduzidos em comparação com as outras linhagens celulares mencionadas, figura 39.

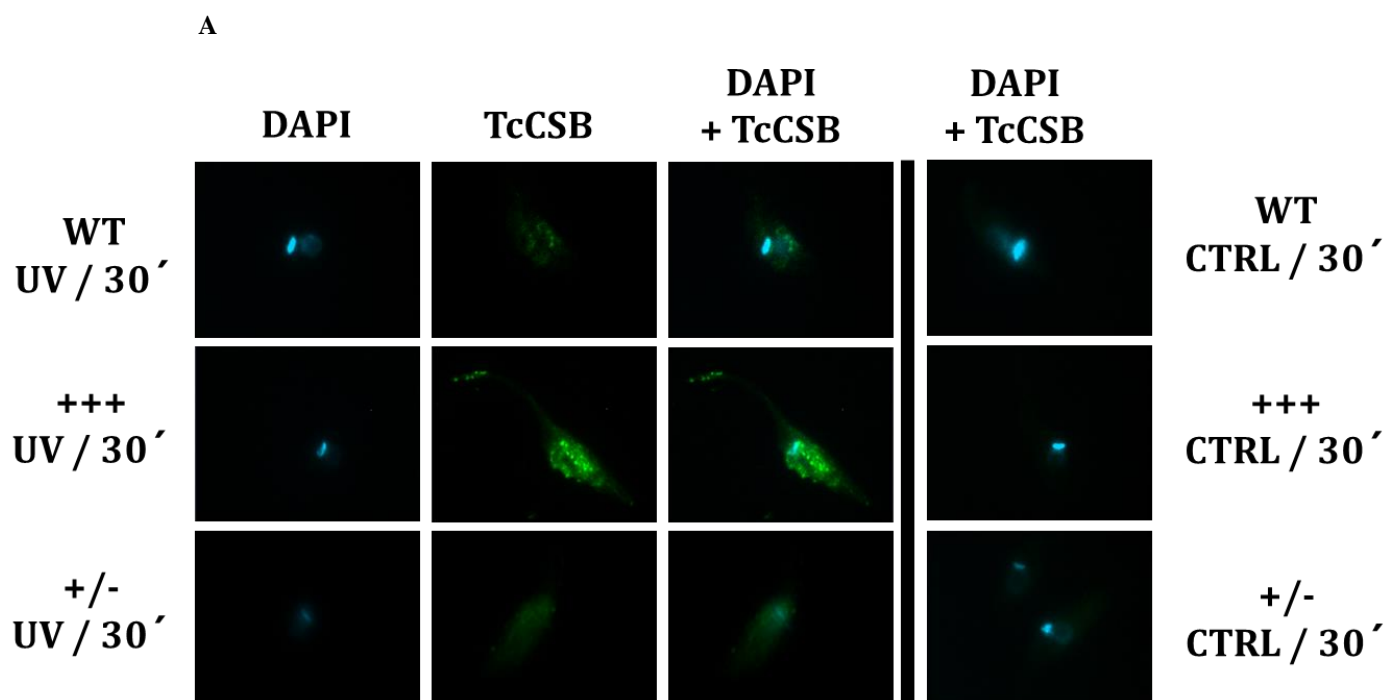


Figura 39 - Imunolocalização de CSB trinta minutos após irradiação UV-C em linhagens de *T. cruzi*. A) **Painel à direita da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens controle não irradiadas (tempo 30 min): célula selvagem (CL Brener – WT / CTRL); linhagem superexpressora de TcCSB (+++/CTRL); linhagem heminocaute de TcCSB (+/-/CTRL). **Painel à esquerda da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens irradiadas com 500 J/cm² após 30 min: célula selvagem (CL Brener – WT +UV/30'); linhagem superexpressora de TcCSB (+++ +UV/30'); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- +UV/30'). A detecção de TcCSB foi realizada com o anticorpo primário anti-CSB e secundário anti-mouse IgG de cabra conjugado com o Alexa Fluor 488. A coloração do DNA nuclear e do cinetoplasto (DAPI) foi realizada com o Hoechst 33342.

Duas horas após a irradiação UVC, na linhagem selvagem ainda observamos focos de TcCSB ao redor do núcleo das células, porém esses focos granulares parecem ser maiores e sua marcação mais intensa do que o que vimos no primeiro momento, no entanto, essa localização se distingue do que é observado nesse tempo para as linhagens superexpressora e heminocaute onde duas horas após a irradiação com UV-C a proteína TcCSB encontra-se em uma nova localização na célula, distribuída no citoplasma em focos granulares que são vistos em menor e maior quantidade nas células heminocaute e superexpressora de TcCSB, respectivamente (figura 40;A). Essa localização

citoplasmática dos focos granulares da proteína TcCSB se mantém quatro horas após a irradiação UV-C em todas as linhagens irradiadas, (figura 40;B). No entanto, conforme descrito anteriormente, a proporção do número de grânulos e sua intensidade entre as linhagens está relacionada com os níveis da proteína TcCSB na célula, o que possivelmente correlaciona-se de forma temporal para a formação desses focos e sua indicada migração do perinuclear para o citoplasma do parasito.

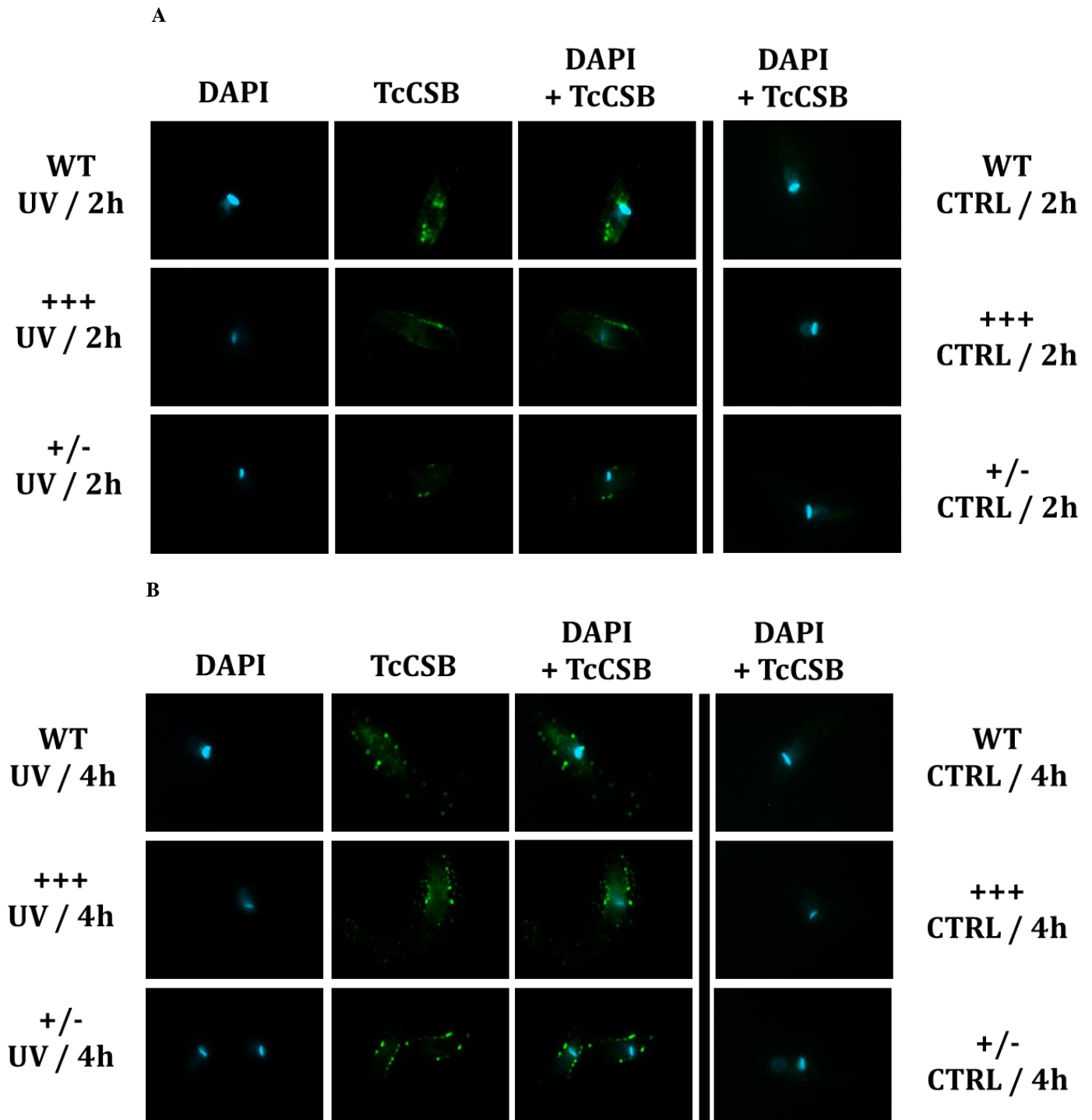


Figura 40 - Imunolocalização de CSB após irradiação UV nos tempos de duas e quatro horas em linhagens de *T. cruzi*: **A) Pannel à direita da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens controle não irradiadas (tempo 2h): célula selvagem (CL Brener – WT / CTRL); linhagem superexpressora de TcCSB (+++/CTRL); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- /CTRL). **Pannel à esquerda da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens irradiadas com 500 J/cm² após 2 horas: célula selvagem (CL Brener – WT +UV/2h); linhagem superexpressora de TcCSB (+++ +UV/2h); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- + UV/2h). A detecção de TcCSB foi realizada com o anticorpo primário anti-CSB e secundário anti-mouse IgG de cabra conjugado com o Alexa Fluor 488. A coloração do DNA nuclear e do cinetoplasto (DAPI) foi realizada com o Hoechst 33342. **B) Pannel à direita da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagem controle não irradiadas (tempo 4h): célula selvagem (CL Brener – WT / CTRL); linhagem superexpressora de TcCSB (+++/CTRL); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- /CTRL). **Pannel à esquerda da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens irradiadas com 500 J/cm² após 4 horas: célula selvagem (CL Brener – WT +UV/4h); linhagem superexpressora de TcCSB (+++ +UV/4h); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- + UV/4h). A detecção de TcCSB foi realizada com o anticorpo primário anti-CSB e secundário anti-mouse IgG de cabra conjugado com o Alexa Fluor 488. A coloração do DNA nuclear e do cinetoplasto (DAPI) foi realizada com o Hoechst 33342.

Após 24 horas da irradiação UV-C, as células do tipo selvagem e as células superexpressoras de TcCSB não possuem marcação para TcCSB indicando a degradação dessa proteína nessas células anterior a esse tempo. Por outro lado, o mesmo não ocorre nas células heminocaute que ainda apresentam a marcação de TcCSB e indicam a presença da proteína até 24 horas após irradiação, figura 41. Assim, esse dado possivelmente correlaciona-se com o retardo na recuperação do crescimento dessa linhagem após a irradiação UV-C que se mantém parada, conforme descrito anteriormente.

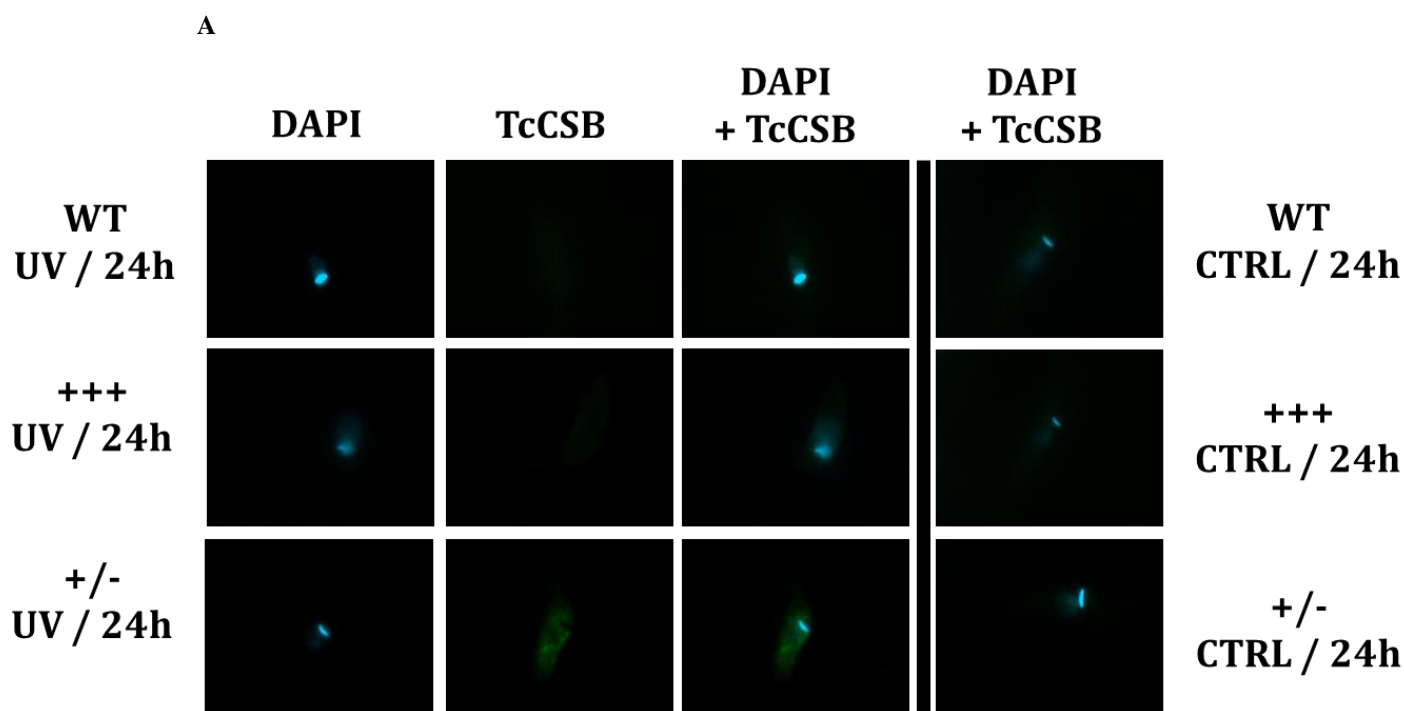


Figura 41 - Imunolocalização de CSB após irradiação UV nos tempos de duas e quatro horas em linhagens de *T. cruzi*: A) Pannel à direita da linha: Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens controle não irradiadas (tempo 24h): célula selvagem (CL Brener – WT / CTRL); linhagem superexpressora de TcCSB (+++/CTRL); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- /CTRL). **Pannel à esquerda da linha:** Imagens de imunofluorescência para a proteína TcCSB de células epimastigotas linhagens irradiadas com 500 J/cm² após 24 horas: célula selvagem (CL Brener – WT +UV/24h); linhagem superexpressora de TcCSB (+++ +UV/24h); linhagem heminocaute de TcCSB (+/- + UV/24h). A detecção de TcCSB foi realizada com o anticorpo primário anti-CSB e secundário anti-mouse IgG de cabra conjugado com o Alexa Fluor 488. A coloração do DNA nuclear e do cinetoplasto (DAPI) foi realizada com o Hoechst 33342.

5. DISCUSSÃO

A transcrição policistrônica em tripanossomatídeos, assim como a via de resposta a danos ao DNA para o reparo acoplado a transcrição (TC-NER), opera em um cenário muito particular em relação ao que acontece nos demais eucariotos (MACHADO, C. R. et al, 2014; I, MENDES; I., 2015). Nesses organismos os genes que codificam para proteínas estão organizados em unidades policistrônicas, contendo apenas um promotor. Tais unidades, ao serem transcritas, geram um único transcrito primário multigênico que originará mRNAs maduros através do processo de *trans-splicing* (DANIELS, J.P et al., 2010). Em consequência do baixo número de promotores, os quais provavelmente permanecem constitutivamente ativos, a transcrição nestes parasitos é uniforme e extensiva ao longo de todo o genoma (SIEGEL, T. N. et al., 2009). O estudo do TC-NER em *T. brucei* revelou que o gene TbCSB desempenha uma função importante na sobrevivência do parasito após a exposição à UV, uma vez que o RNAi desse gene resultou em um aumento pronunciado na morte celular em relação aos controles e um fenótipo similar foi observado pelo aumento da sensibilidade à cisplatina, assim como, o aumento dessas lesões que persistem nas células tratadas após RNAi de TbCSB, desse modo esses dados indicam que o reparo de danos causados tanto por cisplatina quanto por UV são impedidos pela perda de TbCSB (MACHADO, C. R. et al, 2014). Logo, essas evidências denotam a importância da via de reparo de DNA acoplado à transcrição na sobrevivência de *T. brucei* ao estresse transcricional.

Em *T. cruzi*, o TC-NER tem revelado inúmeras evidências de sua participação efetiva para a sobrevivência desse parasito e nosso grupo de pesquisa traz dados que ressaltam a importância do estudo dessa via nesse parasito. Descrevendo que após a exposição á radiação UVC a subvia TC-NER está envolvida na resposta aos danos gerados por este agente, influenciando a sobrevivência imediata do parasito à exposição UV. De modo que os níveis de TcCSB na célula influenciam a taxa de sobrevivência celular possivelmente por influir à sinalização de reparo via TC-NER e a via de resposta a danos ao DNA, onde o excesso de TcCSB (linhagem superexpressora) relacionasse ao fenótipo de alta taxa de morte e a escassez de TcCSB (linhagem heminocaute) logo evita a sinalização para a morte, após a irradiação. Essa sinalização de morte após UV é dependente das quinases ATM e ATR, uma vez que a sinalização para morte imediata em células expostas à UV é dependente dessas cinases que quando são inibidas não

direcionam as células para a morte (MENDES; I. 2015). Essa morte celular sinalizada envolve a exposição de fosfatidilserina à camada externa da membrana celular, conforme observamos na análise de tipo de morte celular (ASSIS, A., 2018).

Assim, nesse trabalho primeiramente verificamos se os fenótipos de sobrevivência e a porcentagem de morte observada após UV, que é dependente dos níveis de TcCSB, decorrem da parada da transcrição frente à lesão. Desse modo, investigamos o fenótipo das linhagens de *T. cruzi* selvagem, superexpressora e heminocaute de CSB sob o efeito da inibição da atividade transcricional quando expostas à UVC. Para isso, as células foram pré-tratadas com α -amanitina um inibidor seletivo da RNA polimerase II e III o qual bloqueia a entrada da RNA Pol II e consequentemente a inicialização da síntese de RNA. Sendo que, após o tratamento com α -amanitina as células são lavadas e o inibidor retirado do meio, permitindo a retomada da síntese de mRNA. Esse composto químico capaz de inibir de forma específica a atividade da RNA polimerase II e III foi descrito em 1970 por Thomas Lindel e colaboradores e desde então, o uso dessa droga tem sido empregado no estudo de fenótipos celulares que decorrem da ausência da transcrição e em especial para o estudo do TC-NER (LEE, K. B. et al., 2002; DOSSIN, F. & SCHENKMAN, S., 2005; IYAMA, T. & WILSON, D., 2016; LIEBELT, F. et al., 2020).

Em tripanossomatídeos o uso do inibidor α -amanitina foi relatado em 1991, em *T. brucei*, no estudo da maturação do pré-mRNA policistrônico em transcritos de RNA nascente do *locus hsp70*, no qual demonstrou-se que α -amanitina era capaz de inibir especificamente a RNA polimerase II, levando ao decaimento das moléculas nascentes de RNA do *locus* estudado, conforme descrito por HUANG, J. & VAN DER PLOEG, L. H. T., 1991. Essa inibição da transcrição em células tratadas com α -amanitina é acompanhada pelo desaparecimento da subunidade RPB1. A taxa de degradação de RPB1 da RNA pol II causada por α -amanitina é dose-dependente. Assim, em contraste com outros inibidores, como a actinomicina D ou 5,6-dicloro-1-b-D-ribofuranosilbenzimidazol que atuam reversivelmente na transcrição, a inibição por α -amanitina é um processo irreversível devido à destruição de RNA Pol II. Desse modo, α -amanitina desencadeia especificamente a degradação da subunidade RPB1, (NGUYEN, V. T. et al., 1996) impedindo a célula de iniciar a próxima rodada de síntese da transcrição e por isso é utilizada para inferir o papel da transcrição ausente e pode ser

utilizada para estudar o TC-NER e a sinalização de resposta a danos DNA decorrentes nesse âmbito do estresse transcricional em *T. cruzi*.

Nesse contexto, ao inibirmos a entrada da RNA Pol II e assim a inicialização da síntese de RNA ao invés da RNA polimerase em síntese, nossos resultados demonstram que o fenótipo de morte observado logo após a exposição à UVC é dependente do processo de transcrição ativo em etapa inicial de síntese do RNA policistrônico, porque sob o efeito da inibição da atividade transcricional (α -amanitina +) as células são significativamente mais resistentes que as células selvagens cuja a transcrição está ativa em todas as suas etapas da síntese. Evidenciando que a presença da RNA Pol II colapsada frente à lesão durante a etapa de inicialização pode sinalizar para a morte, de modo dependente da presença de CSB em níveis adequados. Uma vez que, o excesso de TcCSB (superexpressor) não conferiu resistência a UV-C, pelo contrário, os parasitos mostram alta taxa de morte (MENDES, I. C. 2015). Nesse contexto, sugerimos que na possibilidade da ocorrência da síntese translesão a qual deve diminuir a velocidade da RNA Pol II o excesso de CSB possa encontrar mais dessas RNA polimerases lentas, reconhece-las e para-las. Desse modo, CSB somado ao reconhecimento da RNA polimerase colapsada parada frente à lesão gerada por UV leva a sinalização de morte em especial em etapa inicial da síntese de RNA onde pode ocorrer o surgimento de R-loop culminando na morte celular apoptótica.

Logo, a morte imediata após UV-C é dependente da transcrição colapsada frente a lesões causadas por UV em etapa inicial de síntese de RNA a qual é reconhecida por CSB. Além disso, os níveis de TcCSB influenciam a via de resposta a danos ao DNA em *T. cruzi*. Ademais, em nossos resultados observamos um fenótipo de resistência à UV-C relacionado à ausência da transcrição em células pré-desafiadas por irradiação gama (500Gy) a qual leva à parada de crescimento celular acompanhado da inibição de síntese de novos RNAs após 48h. Nesse contexto, no intervalo de 48 até 96 horas de quiescência celular essas células são resistentes à UV-C. Sugerindo que essas apresentam uma sinalização de resposta a danos no DNA que leva ao comprometimento da síntese de novos RNA nesse intervalo de tempo, o que possivelmente se deve à existência de danos à célula que impeçam a inicialização de síntese de novos mRNAs e assim evitando confrontar a atividade da RNA PolIII o que pode gerar conflitos vindouro do colapso da mesma e desse modo induzir a sinalização de morte celular.

Esses resultados se correlacionam com os dados apresentados por Teruaki Iyama & David M. Wilson, em 2016, que utilizaram da tecnologia que integra micro-irradiação a laser e microscopia confocal para o estudo de recrutamento e retenção de CSB em sítios de dano ao DNA. Os dados indicam que o recrutamento de CSB é influenciado pelo tipo de dano ao DNA, sendo esse recrutamento mais rápido e eficiente para danos volumosos como ICLs (*interstrand crosslinks*) e monoadutos de DNA e esses envolvem a via de CSB de uma maneira associada à transcrição, uma vez que a inibição da inicialização da transcrição por α -amanitina reduziu o acúmulo de CSB a sítios de dano ao DNA. (IYAMA, T & WILSON, D. 2016).

Outro parâmetro descrito por nós, foi o crescimento das células após UVC nos grupos controle e pré-tratado com α -amanitina. Visto que, após o tratamento com a droga, as células foram lavadas para que o inibidor fosse retirado do meio, permitindo assim a retomada da inicialização da síntese de RNA pela RNA PolIII e III. Desse modo, descrevemos que com o passar das horas, as células selvagens pré-tratadas e desafiadas com UV são em parte direcionadas à morte, como observado na curva de crescimento nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após irradiação o que sugere que problemas relacionados à retomada da inicialização da síntese de RNA em regiões colapsadas por danos gerados por UV podem levar a morte. Esse fenótipo é observado de forma mais acentuada na linhagem TcCSB^{+/-} do que nas células não tratadas com α -amanitina (WT controle e TcCSB^{+/-} controle), o que denota uma possível ineficiência da linhagem heminocaute de CSB em lidar com o estresse transcricional e assim ativar o reparo via TC-NER de modo a permitir o reparo de lesões e logo à retomada inicialização da síntese de RNA em regiões colapsadas por danos o que leva a sinalização de morte celular após UV.

A cinética da atividade transcricional em extratos nucleares de fibroblastos normais após 1 hora à exposição UV-C mostrou uma atividade fortemente reduzida da RNA PolIII. Contudo, a atividade de transcrição é totalmente restaurada nos extratos 6 horas após o desafio com UV-C. (ROCK, D. A. P. et al., 2000) e a inibição da transcrição após a irradiação UV é pelo menos parcialmente causada pela repressão do início da transcrição e não apenas pelo alongamento bloqueado nos locais das lesões. Caso isso ocorra em *T. cruzi*, explicaria a morte observada em parte da população durante a análise de crescimento de células pré-tratadas com α -amanitina exposta à UV

onde a retomada da transcrição tem efeito deletério e progressivo com o passar das horas nas células selvagem e heminocaute de TcCSB desafiadas, demonstrando ineficiência para sinalizar o reparo via CSB e possivelmente nesses casos, a incapacidade de iniciar a próxima rodada da transcrição dentre 5´a 6 horas, uma vez que, a subunidade RPB1 que promove o *bypass* da lesão *in vitro* e aumenta a resistência ao UV-C *in vivo* (WALMACQ, C. et al., 2012) estar abolida com o tratamento com α -amanitina e deve ser restaurada. Desse modo, a geração da RNA Pol II hipofosforilada após dano ao DNA parece desempenhar um papel crucial na restauração da transcrição após UV (ROCK, D. A. P. et al., 2000; BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). Os dados descritos anteriormente são similares ao observado em células humanas deficientes em CSB após UV-C, onde a recuperação da síntese de RNA é atrasada nas células CSB (deficientes) após a exposição à radiação UV, além do mais, a RNA Pol II está envolvida na retomada da transcrição nas células CSB deficientes e essa é completamente abolida pela α -amanitina sugerindo que a transcrição reduzida nessas células é mediada principalmente pela RNA polimerase II e a recuperação da síntese de RNA correlacionam-se com os níveis de CSB na célula (BALAJEE, A. S. et al., 1997).

Ademais, além do período inicial descrito anteriormente (5`ate 6 horas) após irradiação UV, onde relatamos a morte de parte da células pré-tratadas com α -amanitina e irradiadas com UV, seguimos a acompanhar o crescimento celular das mesmas dentre o período de 72 horas após os tratamentos. E podemos relatar que parte das células sobreviventes da linhagem selvagem tratada com UV e/ou pré-tratadas com α -amanitina permanecem em parada transitória de crescimento até 24 horas. Por outro lado, as células heminocaute de CSB permanecem mais tempo em parada transitória de crescimento persistente até 72 horas depois de irradiadas. Desse modo, propomos que em células heminocaute de CSB tratadas com UV, a sinalização decorrente da falta de CSB leva a parada de crescimento celular através de uma possível sinalização persistente para ativar o reparo via TC-NER a qual influencia a via de resposta a danos ao DNA levando a parada de crescimento celular.

Logo, em *T. cruzi* a via TC-NER e seu sensor TcCSB em níveis adequados influenciam como estímulo à sinalização de reparo, retomada da transcrição eficiente e sinalização da via de resposta a danos ao DNA de caráter resolutivo a fim de permitir a

retomada de crescimento do parasito. Isso está em concordância com o trabalho de ANDRADE-LIMA, L. C. e colaboradores (2015) que descreve a cinética de reparo de DNA e recuperação da síntese de RNA em células humanas expostas à UV-C. Eles demonstraram que a retomada da transcrição e a recuperação eficiente da síntese de RNA e crescimento celular logo após a irradiação UV requerem o TC-NER funcional dependente de concentração de CSB (ANDRADE-LIMA, L. C. et al., 2015). Ademais, após UV-C diferentes perfis de recuperação da transcrição foram encontrados para genes individuais, mas essas diferenças não se correlacionaram totalmente com as diferenças no reparo do DNA desses genes. Nesse estudo há uma visão ampla do genoma e de como as lesões induzidas por UV afetam a transcrição e como a recuperação da síntese de RNA de grandes genes é particularmente atrasada pela falta de retomada da transcrição por polimerases interrompidas (ANDRADE-LIMA, L. C. et al., 2015).

Contrapondo as linhagens anteriormente descritas, em *T. cruzi*, o excesso de CSB levou à morte de grande parte das células quando desafiadas com UV e da porção sobrevivente essas são capazes de retomar o crescimento até 24 horas. Dessa forma, esses dados sugerem que o excesso de CSB denota uma possível eficiência dado a sua serventia para ativar o reparo via TC-NER e assim a célula lidar com o estresse transcricional e de modo a permitir o reparo de lesões e logo influenciar a sinalização de resposta a danos de forma a permitir a retomada de crescimento após 24 horas do desafio com UV. No entanto, o mesmo não se aplica a essa linhagem superexpressora de CSB desafiada com UV sob o efeito da inibição da atividade transcricional em etapa de inicialização de síntese de RNA (pré-tratada com α -amanitina), uma vez que essa linhagem demonstra o fenótipo de alta taxa de sobrevivência ao desafio à exposição UV.

Essas células sobreviventes não demonstram sensibilidade na etapa de retomada da síntese de transcrição após UV dentre os tempos de 5' e 6 horas após irradiadas. Logo, na ausência da transcrição colapsada frente a lesões causadas por UV em etapa inicial de síntese de RNA o excesso de CSB é capaz de reconhecer um maior número de RNA polimerases ativas colapsadas durante a síntese do poli-*cistron* sendo essas acometidas por danos gerados por UV o que leva ao bloqueio da mesma frente à lesão e da síntese do RNA. Nesse contexto, o excesso de CSB influencia a sinalização inicial de

reparo via TC-NER e as distinguem da linhagem selvagem e heminocaute denotado uma sinalização que possivelmente leva ao reparo de DNA eficiente e à sinalização de danos ao DNA que permite a sobrevivência celular.

Todavia, além do período inicial descrito anteriormente (5`até 6 horas) após irradiação UV onde relatamos a sobrevivência da linhagem superexpressora de CSB pré-tratada com α -amanitina e irradiada com UV, seguimos a acompanhar o crescimento celular da mesma e controles dentre o período de 72 horas após os tratamentos. E os nossos resultados demonstram que as células CSB+++ pré-tratada com α -amanitina permanecem mais tempo em parada transitória de crescimento persistente até 48 horas depois de irradiadas, diferente do fenótipo descrito para a mesma linhagem sem o tratamento com o inibidor e desafiada com UV a qual retoma o crescimento celular 24 horas após o desafio. Desse modo, sugerimos que a sinalização de parada transitória do crescimento seja distinta do observado nas linhagens selvagem e CSB+/- . Desse modo, sugerimos que o excesso de CSB remanescente influencia a resposta a danos ao DNA de modo que essa linhagem exija um maior tempo de parada transitória de crescimento a fim de desligar o excesso de sinalização ativado para o TC-NER via CSB e assim permitir a retomada de crescimento. Contudo, os dados obtidos nesse trabalho ao avaliar o papel da transcrição ativa na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico em *T. cruzi* em especial no contexto da inicialização da transcrição em regiões colapsadas por danos ressaltam mais uma vez a importância da via TC-NER e seu sensor TcCSB em níveis adequados para influir como estímulo à sinalização de reparo, retomada da transcrição eficiente e sinalização da via de resposta a danos ao DNA após UV.

Em *T. cruzi* devemos, então, considerar dois pontos importantes que são: o impedimento da célula de iniciar a próxima rodada de transcrição e a concentração de CSB que juntos são interpretados como sinal para morte dentre 4 horas após irradiação UV-C. Essa evidência foi comprovada pelo nosso grupo de pesquisa em estudo dos tipos de mortes em *T. cruzi* após a exposição à UVC, nosso grupo realizou uma análise da coloração da anexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo nas células após exposição à radiação. Uma hora após a exposição aos raios UV, 17,87% das células apresentaram apenas coloração com anexina V, um sinal de células apoptóticas precoces e 6,20% das células apresentavam coloração com anexina V e iodeto de propídeo e

2,27% das células apresentavam apenas coloração com iodeto de propídeo. Após 4 horas, podemos observar que a porcentagem de células coradas apenas pela anexina V aumentou para 23,4%. A diferença mais notável, no entanto, é que o percentual de células coradas pelos dois corantes aumentou para 26,7%. Este resultado demonstra que a morte rápida observada após o tratamento com UV é sinalizada e envolve a exposição de fosfatidilserina à camada externa da membrana celular nas primeiras 4 horas, indicando morte celular principalmente por via apoptótica. Desse modo, a morte celular observada em *T. cruzi* após UV-C é sinalizada pela célula (ASSIS, A. 2018), em concordância com o que foi descrito para *T. brucei* onde maiores níveis de morte celular estão associados à exposição de fosfatidilserina à camada externa das células (VIEIRA-DA-ROCHA, J. P. et al., 2019).

No entanto, devemos também considerar que em *T. brucei* foi visto que lesões induzidas por UV nem sempre são reparadas. A densidade de lesão dentro de uma região de ~ 10 kbp do DNA nuclear foi de ~ 1,5 lesões de bloqueio de PCR para o *locus* testado, e o reparo foi notavelmente lento, uma vez que não houve redução clara na densidade da lesão por até 10 h após o tratamento (MACHADO, C. R. et al, 2014) assim sugerimos que esse parâmetro também seja investigado em *T. cruzi* para as linhagens em estudo. Essa evidência anterior descrita em *T. brucei* está possivelmente relacionada à própria natureza dos danos causados por irradiação UV-C que são principalmente dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 (6-4 PPs) no DNA. Os CPDs compreendem cerca de 70-80% das lesões geradas por UV, enquanto que os 6-4 PPs correspondem de 20-30% (SUQUET, C. et al., 1993), sendo que a eficiência de reparo dos CPDs é menor comparada à cinética de remoção dos 6-4 PPs no DNA devido ao fato dos CPDs não ocasionar grandes distorções na dupla hélice e serem lesões passíveis de tolerância pelas células através de mecanismos de síntese e transcrição translesão, ao passo que os 6-4 PPs, além de causarem maior distorção na estrutura da dupla hélice, são capazes de levar ao bloqueio das DNAs polimerases replicativas e da RNA polimerase durante a transcrição, exigindo uma remoção mais rápida e eficiente (TIJSTERMAN, M. et al., 1999).

A RNA PolIII tem uma capacidade intrínseca de síntese translesão (TLS) que permite o desvio do CPD com ou sem reparo. A síntese translesão é dependente de duas regiões flexíveis da subunidade RPB1 de Pol II que participam da ligação, catálise e

translocação do substrato. Essas estruturas em RPB1 que promovem o *bypass* da lesão *in vitro* aumentam a resistência ao UV-C *in vivo*, e as substituições dessas inibem o *bypass* da lesão e diminuem a sobrevivência celular após a irradiação UV. Assim, a transcrição translesão torna-se essencial para a sobrevivência da célula após o acúmulo das lesões CPD não reparadas no DNA genômico, conforme descrito por WALMACQ, C. et al. (2012). Desse modo, podemos considerar que o bloqueio da transcrição para determinados tipos de lesões pode ser tolerado através de um processo de transcrição translesão, como já foi sugerido na forma sanguínea de *T. brucei* (MACHADO, C. R. et al., 2014), e esse evento deve ser investigado em *T. cruzi* a fim de contemplar os mecanismos de síntese de transcrição translesão em células sobreviventes a exposição à UV.

A passagem da RNA polII por CPDs para a síntese translesão também é dependente de CSB, que representa, neste contexto, um ponto em comum entre as vias de TC-NER e transcrição translesão (LEE, S. K. et al., 2002). Sugerimos, dessa forma, que TcCSB controla a passagem da RNA polimerase II através de lesões geradas por UV. Nas células heminocaute com a ausência de TcCSB, esse controle é perdido e a passagem da RNA PolII por essas lesões torna-se mais eficiente, o que aumenta a abundância de mRNA. É possível que a necessidade dos tripanossomatídeos, em garantir continuamente a transcrição multigenicas, implique em menor acurácia na produção de pré-mRNA, diante de algumas lesões. Isso pode contribuir para que as células sejam resgatadas da morte, ao evitar um acúmulo extensivo de RNA polimerases bloqueadas nos sítios das lesões geradas por UV em *T. cruzi*, (MENDES, I. C. 2015). Assim, do mesmo modo que, os danos gerados por UV em *T. brucei* podem ser contornados por síntese de translesão, ou removidos via TC-NER de modo dependente de TbCSB para a detecção de tais lesões (MACHADO, C. R. et al, 2014; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P .et al., 2019) e possível que esse cenário ocorra em *T. cruzi* de acordo com os nossos resultados.

Contudo, toda a discussão anterior a respeito de como a transcrição colapsada em etapa inicial de síntese do mRNA em regiões de danos ao DNA causados por UV podem levar a sinalização de morte celular apoptótica leva-nos a teoria que consubstancia várias tentativas do parasito em resolver os danos ao DNA através da ativação da via de sinalização para o reparo acoplado a transcrição e ativação da via de

resposta a danos ao DNA do *T. cruzi*, permitindo assim a sobrevivência e resiliência ao estresse genotóxico. Portanto, a partir de agora discutiremos a cerca de como decorre a via de resposta a danos ao DNA (DDR) em células acometidas pelo estresse transcricional gerado por UV. Desse modo, na ocorrência de danos ao DNA a escolha do sistema de reparo a ser usado depende tanto do tipo de lesão quanto da fase do ciclo celular da célula. Os quais podem influenciar o reparo acoplado à transcrição e direcionar a via DDR, delimitando assim a sobrevivência da célula e reparo eficiente ou a morte celular (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008).

Na DDR a ativação das cinases ATR e ATM leva à fosforilação de proteínas centrais à resposta a danos no DNA, CHK1 e CHK2. CHK1 e CHK2, que por sua vez, regularão os mecanismos efetores da DDR, promovendo a modulação de funções celulares relacionadas a vias de apoptose, reparo de DNA, parada do ciclo celular e remodelamento da cromatina (ZHOU & BARTEK, 2004). A localização de ATR e ATM e a fosforilação de H2AX nos locais da lesão ocorrem dentre os dez minutos iniciais em células assíncronas e também paradas em G1, mostrando que o reparo e o *checkpoint* mediado por ATR e ATM começam cedo após irradiação. Assim, dados fornecem evidências de que a ativação de ATR induzido por UV e a ativação de ATM diferem nas fases G1 e S devido à existência de tipos distintos de lesões de DNA, que promovem a montagem de diferentes proteínas envolvidas no processo de reparo de DNA e ativação do *checkpoint* (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008).

Em *T. cruzi*, os nossos resultados prévios descrevem que a sinalização de morte após UV é dependente das quinases ATM e ATR, uma vez que a sinalização para morte imediata em células expostas à UV é evitada quando essas quinases são inibidas e logo não direcionam as células para a morte (MENDES; I. 2015). Porém, as relações entre essas cinases e como decorre sua ativação de forma dependente da fase do ciclo celular em *T. cruzi* ainda é desconhecida, em especial para a suas correlações com o estresse transcricional e a via de sinalização de danos ao DNA. Desse modo, questionamos se essa morte observada em *T. cruzi* após UV em virtude da transcrição colapsada em etapa inicial de síntese está relacionada a alguma fase do ciclo celular? Assim, considerando essas informações descrevemos a influência das fases do ciclo celular na sinalização de morte após o tratamento com UV em *T. cruzi*.

Em *T. brucei*, as relações entre a transcrição ativa que é colapsada por danos ao DNA em fases específicas do ciclo celular foram descritas por Marcelo da Silva e colaboradores (2019) e relatam que o panorama de transcrição ciclo celular fase-dependente demonstrou que esse organismo não limita sua transcrição e a mesma ocorre durante todas as fases do ciclo celular (G0 / G1, S e G2 / M), incluindo durante a replicação (S), o que pode levar a potenciais colisões entre a maquinaria de replicação e a transcrição (DA SILVA, S.M., et al 2019). Em consonância com o descrito por Priscila M. Hiraiwa e colaboradores em 2018 utilizando o método para medidas precisas das taxas de transcrição (*Run-on*) e relatam que 74,03% \pm 2,94 das células transcreveram o RNA nascente, ou seja, estão com a transcrição ativa (HIRAIWA, M. P., et al, 2018). Contemplando as informações anteriores, partimos para investigar a influência das fases do ciclo celular em resposta a exposição à radiação UV nas linhagens de *T. cruzi* selvagem CL Brener e TcCSB+/- que foram sincronizadas com o pré-tratamento com hidroxiuréia (HU), (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 20 mM por 24 horas como descrito por UMAKI, A. C. em 2013.

Em *T. cruzi*, os nossos resultados da análise de fenótipo para as células selvagem sincronizadas na fase G1 (5´) demonstram que essas foram significativamente mais sensíveis à UVC em comparação com as células controle não sincronizadas e irradiadas. Desse modo, a fase G1 do ciclo celular está relacionada a uma sinalização de resposta a danos ao DNA de caráter pró-apoptótico. Ademais, as fases: início de S (3h) e S (6h) não influenciaram significativamente a sobrevivência do parasito à exposição UVC e não se distinguem entre as linhagens estudadas. Entretanto, a fase G2 está relacionada à resistência do parasito à exposição UVC, uma vez que, a célula selvagem sincronizada na fase G2 foram significativamente mais resistentes que as células selvagens não sincronizadas. Assim, a fase G2 do ciclo celular está relacionada a uma sinalização de resposta a danos ao DNA de caráter anti-apoptótico.

Desse modo, nossos resultados permitem concluir que a fase G1 do ciclo celular afeta a sobrevivência à exposição UVC em *T. cruzi*, onde G1 leva à morte (pró-apoptótico). Por outro lado, outros trabalhos descrevem que o fenótipo vindouro da sinalização de danos após irradiação ionizante induz a parada de crescimento celular e o acúmulo de células na fase G1 e não para a sinalização de morte. Como é descrito em *T. brucei* onde quebras de dupla-fita (DSBs) levam concomitante a parada do ciclo celular

na fase G1/S (MARIN, P. A. et al., 2018) e esse acúmulo de células em G1 também foi observado em *T. cruzi* após 500 Gy (GARCIA, J. B. F., et al., 2016), desse modo evidenciando que conflitos gerados por danos ao DNA em fase G1 sejam capazes de reprimir a progressão do ciclo celular e ou levar a morte apoptótica de acordo com a origem do agente genotóxico.

Contudo, sugerimos que a sinalização de danos ao DNA gerados por irradiação gama em *T. cruzi* direcione a célula para o *checkpoint* em fase G1/S e assim impossibilitando que essas progridam para a próxima fase do ciclo celular levando a parada do ciclo celular em G1/S e a inibição da síntese de novos mRNAs a fim de evitar conflitos da RNA PolIII que possam levar a morte apoptótica. Desse modo, sugerimos que nesse contexto a sinalização celular induza a parada de crescimento transiente em fase ciclo celular dependente a fim de realizar o reparo das lesões no DNA, tendo em vista que, as quebras de fita dupla de DNA (DSB) nas fases S e G2 serão prontamente reparadas por recombinação homóloga (HR) utilizando as cromátides irmãs (BRANZELI, D.; & FOIANI, M. 2008). No entanto, à medida que as células progridem para G2/M, os cromossomos são condensados em uma estrutura de cromatina altamente ordenada o que dificulta a busca por homologia e a HR. Nesse caso, o reparo por NHEJ ocorre na fase G1 subsequente, caso o *checkpoint* e DDR não induza a parada do ciclo celular durante as fases G2 e M (FRANCHITTO, A., et al, 2003; DEMING, P. B., et al, 2002).

Contudo, nossos resultados permitem concluir que, as fases G1 e G2 do ciclo celular afetam a sobrevivência à exposição UV em *T. cruzi*, onde G1 leva à morte (pré-apoptótico) e G2 leva a sobrevivência do parasito (anti-apoptótico). Em *T. brucei*, como mencionado anteriormente, lesões de DNA que levam ao conflito replicação-transcrição são geradas endogenamente predominantemente durante a fase S e permanecem até a fase G2 quando o parasito repara o dano e a fosforilação de γ H2A é removida. Do mesmo modo, há o surgimento de *R-loops* nesses locais ao longo das fases G1/S os quais são reparados primordialmente até que a célula progrida da fase G2, uma vez que essas estruturas se tornam raras durante a mitose e citocinese. Ademais, foi comprovado que a co-localização de γ H2A e *R-loops* em pontos que marcam essas regiões de conflito é dependente da transcrição ativa em etapa de síntese de mRNA, uma vez que o oposto é descrito quando a transcrição foi inibida por α -amanitina (DA SILVA, S.M., et al 2019). Essas evidências nos levaram a hipótese de que conflitos que geram o estresse

da transcrição em etapa inicial de síntese de mRNA acometido por danos gerados por UV na fase G1 seja um estímulo para a sinalização pró-apoptótica em *T. cruzi*. Assim, questionamos se essa sinalização de morte em G1 também é dependente da formação de *R-loops* em local de início de transcrição colapsado por UV.

As correlações entre conflitos da transcrição gerados por danos ao DNA e formação de *R-loop* estabelecem um novo nível de complexidade na biologia de *R-loop*, em particular em associação com vias de resposta de dano de DNA mediadas por ATR e ATM (HAMPERL, S. et al., 2017). Essa estrutura pode surgir durante a parada da RNA polimerase diante de um dano na fita de DNA, a molécula de RNA recém-sintetizada pode se parear com a fita de DNA molde, formando uma estrutura composta por um híbrido de DNA/RNA e uma fita simples de DNA deslocada, sendo essa estrutura denominada *R-loop* e implicada em diversas condições fisiológicas celulares deletérias (ROY et al, 2010; SANTOS-PEREIRA e AGUILERA, 2015). Como mencionado anteriormente, em *T. brucei*, os resultados sugerem que *R-loop* é gerado em regiões de conflitos de transcrição (DA SILVA, S.M., et al 2019).

Nesse contexto, trabalhos recentes têm demonstrado a participação da proteína RPA (*Replication Protein A*) ligadora de fita simples de DNA na via de DDR. As funções de RPA na via de resposta a danos ao DNA é descrita durante a geração de um duplex curto (~ 8-10 bp) RNA-DNA dentro do "complexo de transcrição". A fita revestida por RPA (RPA-ssDNA) são fosforilados por ATR e constitui um sinal fisiológico essencial para ativar essa via, sendo o complexo alvo-chave assim como um importante regulador das modificações pós-traducionais na DDR (CICCIA E ELLEDGE, 2010; MARECHAL E ZOU, 2015). Em *T. cruzi*, ainda não foram descritas as participações de TcRPA para a via de sinalização a danos ao DNA no contexto do estresse transcricional, em especial para as regiões de início de transcrição colapsada propensas a formação de estruturas de *R-loops*. Logo, questionamos as possíveis correlações de TcRPA com as cinases TcATM/TcATR e a DDR, assim como, a sua cooperação na resolução de *R-loops*. Desse modo, nesse trabalho realizamos estudos para a compreensão de suas funções e correlações com os fenótipos celulares após UV em *T. cruzi*.

Nossos dados demonstram que a linhagem superexpressora de TcRPA submetida à irradiação UVC apresenta um fenótipo de resistência quando desafiadas. Por outro lado, a linhagem heminocaute para o gene TcRPA desafiada com UV é mais sensível em relação à cepa WT e sua taxa de sobrevivência é menor. Outro fenótipo observado ao acompanhar o crescimento das células desafiadas é que os níveis de RPA influenciam a retomada de crescimento de forma distinta entre as linhagens selvagem, superexpressora e heminocaute após horas à irradiação UV. Nesse período observamos que parte das células superexpressoras de TcRPA irradiadas voltaram a crescer dentro de 24 horas. Por outro lado, apenas uma pequena parte da linhagem selvagem retoma o crescimento, enquanto que as células da linhagem heminocaute permanecem transitoriamente paradas até 72 horas após UV.

Logo, demonstramos que possivelmente o excesso de RPA recobrimo fitas ssDNA protege de alguma forma a célula da morte durante danos gerados por UV evitando a sinalização de morte. Além do mais, o excesso de TcRPA relaciona-se a uma retomada mais rápida do crescimento após UV. Assim, sugerimos que o excesso de RPA seja capaz de recobrir a fita simples de DNA durante a geração de um duplex curto (~ 8-10 bp) RNA-DNA dentro do "complexo de transcrição" de modo a evitar a formação de *R-loops* e desse modo a influenciar no estímulo à sinalização de reparo, retomada da transcrição eficiente e sinalização da via de resposta a danos ao DNA após UV. Isso seria o oposto para a linhagem TcRPA^{+/-} onde o estímulo de TcRPA se contrapõem à informação anterior onde descrevemos uma taxa de sobrevivência inferior à linhagem TcRPA superexpressora. Ademais, a menor concentração de TcRPA na célula induz uma parada de crescimento transitória mais longa que persiste até 48 horas após irradiação, nesse contexto, as interações entre as proteínas TcRPA/TcATM podem estar diminuídas nessa linhagem, desse modo, os níveis de TcRPA possivelmente influenciam para a resolução cooperativa de conflitos gerados durante o início da transcrição e logo na via de resposta a danos ao DNA de modo a retardar a retomada de crescimento celular.

Assim, em *T. cruzi* a TcRPA pode ser uma importante mediadora das interlocuções entre as proteínas da via de resposta a danos ao DNA e o reparo acoplado a transcrição. Evidências demonstram que a sinalização de danos ao DNA em células tratadas com radiação ionizante, tanto ATR quanto RPA encontra-se co-localizadas em

focos nucleares pontilhados nas células em fase S e G2 e a translocação de RPA nessas fases é dependente de ATR (BARR, M. S., et al, 2003). Em *T. cruzi*, nossos resultados prévios denotam que as células da linhagem RPA^{+/-} quando pré-tratada com os inibidores das cinases ATM e ATR não foram capazes de evitar a morte sinalizada, ao contrário do que acontece nas linhagens do gene TcCSB estudadas, as quais são resgatadas da morte imediata (MENDES, I. C. 2015). Porém, embora a fosforilação de RPA seja induzida em resposta a danos no DNA e sejam frequentemente usadas como sinal para a ressecção de DSB, as células que expressam mutantes fosfomiméticos de RPA apresentam defeitos na recombinação e reparo de DNA (BINZ et al., 2008).

Em *T. cruzi*, foi demonstrado que RPA é importante para o reparo do DNA e assume um padrão nuclear pontuado após tratamento com UV e hidroxiuréia em comparação com um padrão nuclear disperso em células controle (PAVANI, R. S. et al. 2016). Em *T. brucei*, após o dano ao DNA gerado por irradiação ionizante a intensidade de fluorescência de RPA1 aumentou no núcleo de 30 min até duas horas após o tratamento de IR com um pico máximo observado uma hora após o tratamento de IR (MARIN, P. A. et al., 2018). Assim, as evidências anteriores denotam a importância de TcRPA na célula como possível estímulo para o reparo de lesões que levariam a uma instabilidade genômica. Logo, sugerimos que a sinalização para o reparo eficiente da lesão e parada de crescimento é dependente de estímulo pela presença de TcRPA, como discutido anteriormente. Em *T. cruzi*, por outro lado, a sinalização de morte após UV é dependente de TcATR e TcATM. Essa sinalização decorre independente dos níveis de TcRPA na célula.

Trabalhos recentes relatam que a RPA interage com a proteína RNaseH1 e colocaliza-se com RNaseH1 e *R-loops* em células humanas. Assim, foi proposto que a interação RPA-RNase H1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados ao *R-loop* e morte celular (NGUYEN, H, D. et al., 2017; BELOTSEKOVSKII, P. B. et al., 2018). Porém, caso os híbridos DNA/RNA sejam formados, esses podem ser desfeitos pela ação de enzimas RNases H que degradam a porção de RNA que interage com o DNA (SANTOS-PEREIRA, J. M. & AGUILERA, A, 2015). Ademais, os mutantes de RNaseH1 defeituosos na ligação de RPA não digerem eficientemente híbridos de RNA-DNA *in vivo*, o que leva ao acúmulo de *R-loops*, resultando em instabilidade genômica. Desse modo, foi proposto que a interação

cooperativa entre RPA-RNaseH1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados a *R-loop*.

Em *T. brucei*, foi descrito que o tratamento com RNase H foi capaz de diminuir a intensidade fluorescente dos *R-loops*. Juntos, esses achados sugerem que *R-loops* estão contribuindo para as lesões endógenas de DNA descritas nesse parasito (DASILVA, M. et al., 2019). Ademais, os mutantes RNase H1 defeituosos na ligação a RPA não digerem de forma eficiente os híbridos de RNA-DNA *in vivo* e acumulam *R-loops*, resultando em instabilidade genômica (NGUYEN, H. D. et al., 2017). De modo que, RPA-RNase H1 é necessária para prevenir a geração de danos ao DNA associados ao *R-loop*, de modo, a reconhecer os *R-loops* antes de serem convertidos em quebras de fita dupla (NGUYEN, H. D. et al., 2017; BELOTSERKOVSKII, P. B. et al., 2018). Portanto, buscamos elucidar o papel da superexpressão dos genes TcRNaseH1 e TcRNaseH2A na sinalização a danos ao DNA durante o início da transcrição em *T. cruzi* e seu possível papel na resolução de *R-loops*, uma vez que, caso os híbridos DNA/RNA sejam formados, esses podem ser desfeitos pela ação dessas enzimas que degradam a porção de RNA que interage com o DNA (SANTOS-PEREIRA, J. M. & AGUILERA, A, 2015).

Em *T. cruzi*, os nossos resultados demonstraram que a superexpressão dos genes das RNaseH1 e RNaseH2A conferiu resistência à essas células, logo após a exposição à UV. Outro fenômeno observado, ao acompanhar o crescimento das células, é que a superexpressão dos genes TcRNases H1 e TcRNaseH2A influenciou o crescimento celular após exposição à UV, uma vez que células selvagens apresentam uma parada de crescimento transitória, por outro lado, as linhagens superexpressoras irradiadas foram capazes de retomar o crescimento celular após 24 horas em níveis similares às células não irradiadas. Assim, nossos resultados evidenciam que possivelmente há relações entre os níveis das RNases H1 e RNaseH2A para a via de resposta a danos ao DNA para o reparo acoplado a transcrição em *T. cruzi*, o que nos leva a questionar se esse fenótipo é devido a menor concentração de *R-loops*, o que deve ser investigado pelo nosso grupo em experimentos futuros. Porém, caso ocorra essa diminuição de *R-loops*, possivelmente ela ocorreria devido ao excesso de TcRNase H1 e/ou TcRNaseH2A que aumentaria as interações RPA-RNaseH estimulando o reconhecimento dos *R-loops* e possivelmente sua degradação. Logo, nossos dados sugerem que em *T. cruzi* a formação

de *R-loops* em células expostas à UV durante a etapa de inicialização da síntese de RNA poderia levar ao colapso da transcrição e assim sinalizar para a morte apoptótica, contudo, a morte poderia ser evitada através da ação resolutiva e cooperativa de TcRPA e TcRNaseH1 e TcRNaseH2A.

Em *Trypanosoma brucei*, tentativas de gerar mutantes nulos para TbRNaseH2A não tiveram êxito, indicando que tal proteína é essencial para este parasito (BRIGGS, E. et al, 2019). Por outro lado, a perda da TbRNaseH1 não é letal e resulta no acúmulo de danos em regiões ativamente transcritas, bem como no aumento das lesões no genoma associadas à replicação (BRIGGS, E. et al., 2018), o que colabora com nossa hipótese anterior. Apesar dos híbridos DNA/RNA desempenharem papéis importantes na regulação da expressão gênica, transcrição e replicação do DNA, o aumento dos níveis de *R-loops* pode resultar na saturação das vias que são responsáveis pela resolução de tais estruturas, culminando em instabilidade genômica. Ademais, em *T. brucei* e *T. cruzi* as proteínas de ligação ao RNA (RBPs), que protegem o RNA mensageiro (mRNA) formado durante a transcrição e prevenindo a hibridização do mesmo com a fita transcrita de DNA (MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al, 2010), podem ser esgotadas rapidamente, sobretudo quando há o aumento dos níveis de *R-loops*. Porém, caso os híbridos DNA/RNA sejam formados, esses podem ser desfeitos pela ação de enzimas RNases H assim degradam a porção de RNA que interage com o DNA (SANTOS-PEREIRA, J. M. & AGUILERA, A, 2015), demonstrando o quão essencial é a atividade de TcRNaseH1 e TcRNaseH2A, em especial para a manutenção da transcrição policistrônica dos tripanossomatídeos. Logo, a presença e também o excesso de *R-loops* pode ser interpretado pela célula como um sinal que leva a sinalização de morte celular apoptótica em *T. cruzi*, após a irradiação UV.

Contudo, toda a discussão anterior a respeito de como a transcrição ativa colapsada em etapa inicial de síntese do mRNA em regiões de danos ao DNA causados por UV leva a sinalização de morte celular apoptótica nos têm levado a hipótese de que essa sinalização decorre através de conflitos vindouros da formação de *R-loops* originários da estrutura colapsada onde se encontra a fita de RNA recém-sintetizada pareada com a fita de DNA molde e RNA PolIII após irradiação por UV. Desse modo, se faz necessário a participação efetiva dos genes TcCSB, TcRPA, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A nesse complexo de como o parasito resolve os danos ao DNA que levam

ao colapso da transcrição através da ação de TcCSB para a ativação da via de sinalização para o reparo acoplado a transcrição em consonância com a ativação da via de resposta a danos ao DNA com a ação cooperativa entre TcRPA, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A na resolução dos *R-loops* de modo a permitir a uma sinalização celular que influa para a sobrevivência e resiliência de *T. cruzi* ao estresse genotóxico transcricional.

No entanto, a via de resposta a danos ao DNA para o reparo acoplado a transcrição vai além da presença ou ausência de determinada proteína e, também, inclui modificações pós-traducionais que ocorrem em RNA Pol II e CSB e essas sim governam o desfecho da célula após irradiação, sinalizando para a morte dependente de interação com as cinases ATM e ATR (BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008; MENDES, I. C. 2015) ou para a parada de crescimento e reparo eficiente. A parada de crescimento celular em resposta à UV-C é sinalizada por proteínas do *checkpoint* e modificações pós-traducionais, com o objetivo de proteger o genoma contra o agente genotóxico, permitindo o reparo e sobrevivência (LAGERWERFA, S. et al, 2011; BRANZEI, D; & FOIANI, M. 2008). Dentre as modificações pós-traducionais, a adição e remoção de ubiquitina (ubiquitinação/deubiquitinação), foram recentemente demonstradas como mecanismos gerais para regular as funções proteicas. Evidências acumuladas mostram que vários fatores NER estão sujeitos a extensiva regulação por ubiquitinação e deubiquitinação (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015).

Assim, o equilíbrio entre as ligases E3 e as atividades das enzimas deubiquitinantes podem alterar dinamicamente a de-ubiquitinação nos locais de dano ao DNA, regulando assim a eficiência do NER (SCRIMA, A., et al., 2008; FISCHER, E.S., et al., 2011). A ubiquitinação é um processo dinâmico e reversível. Uma família de enzimas conhecidas como DUBs (deubiquitinases) desempenham papéis críticos no processamento do precursor da ubiquitina e remoção da ubiquitina das proteínas alvo (BROWN, J.S. & JACKSON S.P. 2015). DUBs mantêm o equilíbrio da dinâmica de ubiquitinação para controlar a estabilidade, atividade e localização da proteína substrato. Ao fazer isso, as DUBs estão envolvidas em uma infinidade de funções celulares, incluindo a homeostase celular, vias de sinalização, transcrição, modificação de histonas e vias de reparo de DNA (CLAGUE, M.J., COULSON, J. M., URBE, S., 2012).

A protease *Ubiquitin Specific Peptidase 7* (USP7) é uma das enzimas deubiquitinantes bem conhecidas devido à sua relevância para a via Mdm2-p53 (ROY, N., et al., 2010). A USP7 também demonstrou desempenhar um papel na resposta ao dano por UV regulando eventos em TC-NER (KEE, Y & HUANG, T. T., 2016). No reparo acoplado a transcrição a proteína CSB sofre modificações pós-traducionais como a ubiquitinação na região C-terminal essencial para a sua regulação via ubiquitina-proteassoma. Esse processo é realizado pelo complexo CSA que conduz à degradação proteassomal do ERCC6, de um modo dose-dependente de UVC, (GROISMAN, R., et al 2006) e que depois de estabilizado, a interação com UVSSA promove o recrutamento da enzima deubiquitinante USP7, levando à deubiquitinação de CSB, prevenindo assim a degradação pelo proteassoma. Considerando os nossos resultados anteriores que denotam a importância de níveis adequados de TcCSB na célula e sua correlação com os fenótipos de sobrevivência e morte em *T. cruzi* após danos gerados por UV buscamos avaliar a influência da inibição do sistema ubiquitina-proteassoma na sinalização de morte após o tratamento com agente genotóxico.

Em *T. cruzi* a busca por homólogos de CSA não levou a evidências para a presença dessa proteína no parasito. Por outro lado, nossos dados predizem uma suposta proteína TcUsp7 - Tc.CLB.510761.70, nos levando a questionar o seu papel no TC-NER e na via DDR. Considerando as informações anteriores sobre a importância do mecanismo de deubiquitinação para o TC-NER em *T. cruzi*, investigamos o fenótipo das linhagens selvagem e TcCSB +/- sob o efeito da inibição da deubiquitinação quando desafiadas com UV. Para isso, as culturas foram pré-tratadas com PR-619, um inibidor reversível de USP7 capaz de se ligar aos domínios preditos em *T. cruzi* UCH e USP7-C2 tornando assim possível a inibição da atividade da mesma conforme com descrito por ALTUN, M e colaboradores em 2011, onde PR-619 inibe substancialmente a atividade de USP7.

Os nossos dados em *T. cruzi* demonstram que, na ausência da deubiquitinação, as células selvagens pré-tratadas são significativamente mais resistentes que as células selvagens não tratadas, logo após a exposição à UVC (5'). Ou seja, a não ação de deubiquitinação nos alvos das DUBs inibidas por PR-619 relaciona-se com o fenótipo de sobrevivência imediata à exposição UVC. Nesse contexto, a inibição da suposta TcUSP7 induziria a poli-ubiquitinação de TcCSB e o fenótipo aqui observado poderia

ser relacionado à ausência de CSB, que após poli-ubiquitinado é degradado, abstendo a célula do sinal de CSB para iniciar o TC-NER e sinalizar a via de resposta a danos ao DNA. Caso sim, outra evidência que colabora com o observado é que células TcCSB+/- quando expostas à UVC apresentam o mesmo fenótipo de resistência imediata, possivelmente pelo mesmo motivo, ausência de TcCSB para o TC-NER e seu estímulo para a via DDR.

No entanto, a linhagem CSB+/- quando pré-tratada com PR-619 e irradiada com UV se distingue, uma vez que essas células se tornaram mais sensíveis à UV. Ademais, a concentração de células sobreviventes após 24 horas à irradiação é a mesma da inicial sugerindo que esse fenótipo é distinto do observado para essa linhagem não tratada e irradiada. Isso sugere uma possível adaptação da via de reparo de DNA e/ou também da via de resposta a danos ao DNA após UV independente do estímulo de TcCSB que é perdido na ausência do controle pós-traducional pela via ubiquitina-proteassoma. Para testar isso se faz necessário realizar outros estudos a fim de mostrar se o inibidor realmente mimetiza uma célula heminocautada de TcCSB e, assim, demonstrar como decorre esse fenótipo celular nos tempos de 1 a 6 horas de modo a descrever posteriormente se a morte observada na linhagem TcCSB₋+/- é decorrente da incapacidade de retomar a transcrição após UV e se essa está sendo influenciada por PR-619 e assim se o número de células após 24 horas são remanescentes de uma parada de crescimento transitória ou são uma porção das células sobreviventes que se multiplicaram após 24 horas da irradiação.

Como observado por SCHWERTMAN, P., et al. 2012, a depleção de USP7 levou à diminuição da síntese de RNA, recuperação e sobrevivência celular após irradiação UV, fenótipo que possivelmente está relacionado diretamente com o TC-NER ineficaz nessas células. Nesse contexto, nosso trabalho destaca a de-ubiquitinação como modificações pós-traducionais que possivelmente influenciam a sobrevivência do *T. cruzi* via TC-NER e a sinalização via DDR. De modo que, a poli-ubiquitinação induzida por PR-619 promoveria a degradação de TcCSB. Outra modificação pós-traducional que ocorre em CSB para a DDR do TC-NER é a SUMOilação (*Small Ubiquitin-like Modifier*) de proteínas em resposta a danos no DNA. Em 2020, o autor Frauke Liebelt e colaboradores demonstraram que CSB é SUMOilado em resposta à irradiação UV-C e a inibição da SUMOilação reduz o acúmulo de CSB em locais de

irradiação UV e reduz a recuperação da síntese de RNA. Embora CSA seja necessário para a eliminação eficiente de CSB SUMOilado, a análise proteômica subsequente de substratos ubiquitinados dependentes de CSA revelou que CSA não ubiquitina CSB de uma maneira dependente de UV. Essa evidência poderia contemplar a presença de USP7 em *T. cruzi* ao contraponto da ausência de um homólogo à CSA. Porém, surpreendentemente, CSA é necessário para a ubiquitinação da maior subunidade da RNA polimerase II, RPB1, (LIEBELT, F. et al., 2020) mas tais modificações pós-traducionais ainda não foram descritas em tripanossomatídeos.

Além do mais, a SUMOilação de CSB é dependente da transcrição ativa e do bloqueio de RNAPII na lesão. Uma vez que em células pré-tratadas com α -amanitina e desafiadas com UV, a SUMOilação de CSB é diminuída. Porém, o bloqueio da iniciação ou do alongamento da transcrição não resultou “em si mesmo” na SUMOilação de CSB, indicando que a transcrição e a parada de RNA PolII frente à lesão são pré-requisitos para a SUMOilação de CSB. No geral, os resultados obtidos por Frauke Liebelt e colaboradores em 2020 fornecem informações importantes para análise das funções de sinalização cooperativa de componentes TC-NER. Combinadas, essas pequenas modificações pós-traducionais como ubiquitinação/deubiquitinação e SUMOilação podem contribuir para a retomada da síntese de RNA presumivelmente por meio de TC-NER eficiente e inicialização da retomada de transcrição eficiente após irradiação UV-C ou levar a apoptose celular, assim, ressaltamos a importância de elucidar esses eventos em *T. cruzi* através das técnicas de estudo de proteômica para identificação e distinção das modificações pós-traducional de TcRNAPolII e TcCSB após UV-C.

Considerando as informações mencionadas, a via de resposta a danos ao DNA em consonância com o reparo acoplado a transcrição (TC-NER) se inicia e se propaga de acordo com as interações proteína-proteína (PPIs) que desempenham um papel fundamental na sinalização para o TC-NER em *T. cruzi*. Desse modo, essas proteínas desencadeiam fenótipos resultantes de um conjunto de interações, por isso, o estudo das PPIs é importante para inferir a função das proteínas na célula (SRINIVASA RAO, V., et al. 2014). Logo, para o estudo da proteína TcCSB e suas interações conduzimos a obtenção do anticorpo anti-TcCSB para inicialmente descrever a localização celular da proteína TcCSB e sua cinética em análise de curso de tempo após tratamento com UV-C

(500 J/cm²). Utilizando a técnica de imunofluorescência descrevemos a cinética de distribuição da proteína ao longo dos tempos de 30', 2h, 4h e 24h após irradiação.

Nossos resultados demonstram que, na linhagem selvagem de *T. cruzi*, a proteína CSB fica concentrada no núcleo e em pequenos *foci* granulares perinucleares após 30 min de irradiação. Nesse tempo, a presença da proteína TcCSB também é observada no kDNA onde há também a presença de pequenos *foci* granulares, assim, surgem hipóteses sobre as funções da proteína TcCSB para o TC-NER no DNA mitocondrial do mesmo modo que no DNA genômico. A presença da proteína CSB em locais de danos ao DNA foi descrita em células humanas utilizando a técnica de imunofluorescência por Vincent Van den Boom e colaboradores em 2004 e descreve que o dano ao DNA estabiliza a interação de CSB com a maquinaria de alongamento da transcrição levando ao acúmulo de GFP-CSB em áreas subnucleares danificadas por UV e essa se inicia antes de 15 min após a irradiação, uma vez que, nesse tempo já são descritos *foci* dessa proteína no núcleo das células, em consonância com o observado em nosso trabalho.

Os nossos resultados da cinética da análise do curso de tempo, após duas e quatro horas à irradiação UV a localização da proteína TcCSB ainda é observada no núcleo e kDNA. De acordo com o descrito em células humanas se observa a marcação de GFP-CSB pelo menos até 8 horas após a irradiação das células e ela se acumula nos locais de dano ao DNA, de modo que, o número de moléculas GFP-CSB acumuladas na área danificada é relativamente estável nesse intervalo de tempo após UV (DEN BOOM, V, V. et al., 2004). No entanto, os nossos resultados da cinética da análise do curso de tempo após duas e quatro horas à irradiação UV a proteína TcCSB também é encontrada em especial em *foci* granulares citoplasmáticos indicando uma migração da proteína do núcleo ao citoplasma. Desse modo, os dados da cinética de TcCSB em células após tratamento com 500 J/cm² dentre 30' e 4 horas demonstra a presença dessa proteína no núcleo e no kDNA e em estruturas granulares *sui generis* em *T. cruzi* as quais devem ser caracterizadas para o entendimento entre as relações entre a sinalização de reparo acoplado a transcrição e sua sinalização de resposta a danos ao DNA e logo suas correlações com a formação dessas estruturas granulares contendo TcCSB .

No entanto, em células de mamíferos já é conhecido que a irradiação UV-C induz a formação de grânulos reversíveis em células irradiadas e a formação desses é dependente de uma dose não letal (10J/cm²) capaz de induzir grânulos em uma alta porcentagem de células, uma exigência para esse estudo que os caracterizou. Essa evidência corrobora com o observado em *T. cruzi*, uma vez que utilizamos a dose não letal de 500 J/cm² em contraponto à dosagem de 1.500 J/cm² utilizada em experimentos anteriores a qual leva à morte de cerca de metade da população de células desafiadas. Contudo, a dose de 500 J/cm² permite a visualização das estruturas granulares similares às descritas por Mohamed Taha Moutaoufik e colaboradores em 2014.

Além do mais, em *T. cruzi* o número de *foci* granulares migratórios contendo a proteína TcCSB relaciona-se diretamente com os níveis dessa proteína na célula irradiada. A maior formação dessas estruturas granulares que ocorrem após a irradiação UV-C é maior na célula superexpressora e menor para as células heminocautas de TcCSB, em comparação com a célula selvagem, o que denota uma relação da cinética de curso de tempo da proteína CSB em *T. cruzi* de acordo com os níveis da proteína na célula. De forma geral, nossos resultados da cinética da proteína TcCSB após UV em *T. cruzi* demonstram que até quatro horas o número de grânulos contendo TcCSB aumenta de forma temporal e indica uma migração do perinuclear para o citoplasma do parasito. No entanto, a não detecção da proteína TcCSB em *T. cruzi* após 24 horas da irradiação UV-C indica que a cinética dessa proteína conclui-se nas células superexpressora e selvagem, anterior a esse tempo, onde essas células não apresentam marcação para TcCSB e presença dos *foci* granulares.

Por outro lado, o mesmo não ocorre nas células heminocautas que ainda apresentam a marcação de TcCSB indicando a presença da proteína nessa célula até 24 horas após irradiação. Ademais, essa linhagem irradiada apresenta um fenótipo de parada de crescimento celular após UV-C o que está em consonância com o descrito por Mohamed Taha Moutaoufik e colaboradores em 2014, em células de mamíferos, uma vez que, após a irradiação UV-C (10 J/cm²) concomitante ao acúmulo de grânulos no citoplasma essas células entram em um estado de quiescência celular o qual direciona essas células à parada de progressão do ciclo celular na fase G1, a fim de, reparar danos ao DNA induzidos pela irradiação UV-C. Este bloqueio persiste enquanto os grânulos estiverem presentes (MOUTAOUFIK, M. T. 2014).

Nesse ponto, surge a correlação entre os danos gerados por UV e o processamento de tais estruturas granulares aqui descritas. Nesse contexto, os nossos dados somam a essa interpretação, uma vez que, *a posteriori* a proteína CSB de *T. cruzi* exerce um papel principal para a ativação e efetividade do reparo acoplado a transcrição após UV sendo localizada no núcleo e kDNA e também presente em tais estruturas granulares que migram do perinuclear ao citoplasma do parasito. Ao considerar essas evidências, propomos a realização de experimentos que possam descrever a relação entre a presença de danos remanescentes na linhagem heminocaute de TcCSB após 24 horas à irradiação UV e a presença de TcCSB em determinada fase-dependente do ciclo celular e sua correlação com a parada transiente de crescimento celular em *T. cruzi*.

No trabalho de Mohamed Taha Moutaoufik e colaboradores em 2014 a caracterização desses *foci* granulares induzidos por UV descreve que, esses são típicos grânulos de estresse (SG), que são corpos de RNA citoplasmáticos bem caracterizados que se formam sob várias condições de estresse, essa informação nos leva a questionar se os grânulos descritos em nossos resultados em *T. cruzi* surgem no mesmo contexto onde observaríamos a proteína TcCSB como constituinte em SG? Ademais, uma vez que, a função final dos SGs é aprisionar e proteger temporariamente o mRNA, no mesmo trabalho, testaram se este também é o caso para grânulos induzidos por UV e o resultado da co-localização confirma a presença de mRNA nesses *foci*. No entanto, devido ao pequeno tamanho dos SGs induzidos por UVC, sugere-se que essas estruturas contribuam para regular a expressão de apenas um subconjunto restrito de mRNAs, (MOUTAOUFIK, M. T. 2014; REINEKE, L. C, 2012).

Portanto, novos estudos devem ser realizados para a caracterização de essa estrutura granular onde se encontra TcCSB além da identificação dos demais constituintes proteicos dos grânulos. Assim, os nossos resultados da cinética da análise do curso de tempo através da localização TcCSB é uma nova descoberta sobre essa proteína e propomos que suas funções vão além do reparo acoplado a transcrição e surgem em um novo cenário. No entanto, conforme postulado esse novo cenário não é distinto do seu contexto principal que é a manutenção da atividade transcricional e a integridade do mRNA. Essas premissas levam-nos a questionar se em *T. cruzi* esses *foci* são grânulos de estresse de mRNA similar aos descritos em células de mamíferos? Caso

sim, quais tipos de mRNAs estão presentes? E por qual motivo TcCSB é direcionado para um grânulo de estresse de mRNA?

Em mamíferos, a caracterização dos grânulos induzidos por UV-C revelou que esses apresentam co-localização com as principais proteínas que constituem um SG, que são: TIA-1, TIA-1/R, Caprin1, FMRP, PABP1 e G3BP1, marcadores bem conhecidos para SG (MOUTAOUIK, M. T. 2014). Nesse contexto, destacamos o papel da proteína de ligação ao RNA, G3BP1 a qual em *T. cruzi* é denominada TcRBP42 (homóloga à G3BP1) sendo essa expressa em todas as formas de desenvolvimento do parasito, sugerindo um papel na regulação da expressão gênica ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. (TYLER WEISBARTH, R. et al., 2018).

O processamento do RNA, o transporte dentro da célula e a localização são mediados por proteínas de ligação ao RNA (RBPs) que determinam o destino do mRNA de acordo com sua composição em um determinado complexo de mRNP (GERSTBERGER, S. et al., 2014; RE, A. et al., 2014). Após o processamento adequado, os mRNAs devem ser transportados para o citoplasma (BJÖRK, P. & WIESLANDER, L., 2017) e, uma vez lá, os mRNAs maduros podem ser sequestrados para a máquina de tradução para síntese de proteínas ou armazenados em grânulos de RNA, que são formados por um processo denominado de transição de fases líquido-líquido, onde serão mantidos em silêncio ou direcionados para degradação (GLISOVIC, T. et al., 2008; ROMAGNOLI, B. A. A. et al., 2020). Em todas as células, os RNAs são cobertos por proteínas e existem como complexos de ribonucleoproteínas. Existem diferentes classes de RBPs com base nos motivos que constituem os domínios de ligação de RNA (RBDs), GLISOVIC, T. et al., 2008; ROMAGNOLI, B. A. A. et al., 2020). TcRBP42, é uma RBP que apresenta um domínio RRM e um domínio do tipo NTF2 o qual está associado ao transporte nuclear-citoplasmático (AIBARA, S. et al., 2015). Em células humanas tratadas com UV G3BP1 (TcRBP42) é está presente no citoplasma mas também é detectada por co-localização nos núcleos e em *foci* perinuclear, após irradiação UV-C. Demonstrando que RBP42 também migra do núcleo ao citoplasma acompanhado de seu conjunto de RNAs (MOUTAOUIK, M. T. 2014).

Desse modo, essas informações demonstram a importância de caracterizar os grânulos com TcCSB após UV em *T. cruzi* e sua composição de proteínas e mRNA.

Nesse contexto, ressaltamos que em nosso laboratório (LGB), possuímos a linhagem superexpressora de TcRBP42 de *T. cruzi*, assim como, o anticorpo para imunofluorescência anti-GFP-TcRBP42 (homóloga de G3BP1, encontrada nos SGs após UV). Em *T. cruzi*, após irradiação gama rTcRBP42 é encontrada em estruturas citoplasmáticas granulares semelhantes a grânulos de RNA. No entanto, 24 h após a indução do estresse, esses grânulos se espalham por todo o citoplasma dos parasitos. No entanto, essa análise não foi descrita para células desafiadas com irradiação UV-C (SOUZA, D. L. 2019). Desse modo, sugerimos experimentos futuros a serem realizados a fim de responder se há interação entre TcCSB e TcRBP42 e se ambas se co-localizam durante algum momento da cinética do curso de tempo em *T. cruzi* após irradiação ionizante e UV e assim evidenciar a conexão entre TcCSB, uma proteína do reparo acoplado a transcrição e o mRNA nascente danificado e interrompido pelo dano ao DNA juntamente a TcRBP42, uma proteína ligadora de RNA que têm como função transportar RNAs defeituosos do núcleo ao citoplasma. Contudo, questionamos, se esses grânulos de estresse contendo RNAs danificados por UV-C e direcionados para degradação e/ou reparo via CSB? Portanto, discutiremos a partir de agora trabalhos que demonstram que a conexão entre controle de qualidade de mRNA e resposta a danos ao DNA está implicada em diferentes organismos, e somam à nossa interpretação das funções de TcCSB para além de seu papel canônico no TC-NER após UV, sendo agora descrito como constituinte em *foci* granular com migração do perinuclear ao citoplasma em *T. cruzi*.

O problema do acúmulo de mRNAs oligocistrônicos vindouros de danos causados durante a produção do transcrito é exclusivo do grupo que realiza *trans-splicing*; os Kinetoplastídeos, (KRAMER, S. et al., 2016). O RNA mensageiro policistrônico dos tripanossomatídeos (mRNA) requer várias etapas de maturação no núcleo via *trans-splicing* (ULLU, E, & TSCHUDI, C. 1991). Em outros eucariotos, o envelope nuclear atua como o principal sistema de vigilância que garante que somente mRNAs maduros cheguem ao citoplasma. Durante a transcrição e processamento, cada mRNA associasse com um conjunto de proteínas que podem direcioná-lo para a degradação ou facilitar sua exportação (SOHEILYPOUR, M. & MOFRAD, M.R.K., 2018). No entanto, apesar da importância do controle traducional do controle da estabilidade do mRNA na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, a conexão entre os grânulos de mRNP e proteínas do TC-NER na regulação do ciclo de

vida permanecem desconhecida nesses parasitos. O mecanismo que distingue os mRNAs destinados ao armazenamento ou degradação no *T. cruzi* parece depender da combinação de diferentes componentes proteicos associados aos mRNAs, que afetam os níveis da expressão gênica durante o ciclo de vida, corroborando a complexidade do processo de regulação da expressão gênica (ROMAGNOLI, B. A. A. et al., 2020)

Em *T. cruzi*, o grupo de pesquisa de Samuel Goldenberg foi pioneiro na identificação de grânulos de RNA com semelhanças com *P-bodies* em *T. cruzi* (HOLETZ, F. B. et al., 2007, 2010). Desde então, vários estudos descreveram a presença de diferentes grânulos de mRNP em *T. cruzi* e *T. brucei*. Em tripanossomatídeos existem pelo menos seis tipos de grânulos de mRNP: grânulos de RNA do tipo *P-body*, grânulos de RNA induzidos por estresse nutricional, grânulos de RNA induzidos por choque térmico, grânulos periféricos nucleares (NPGs), grânulos do polo posterior e grânulos formados por tRNAs. Este vasto repertório de grânulos de mRNP pode ser justificado como uma adaptação à perda do controle transcricional, (KRAMER, S., 2014). Em outros eucariotos, a composição dos grânulos de estresse são definidos pela presença de fatores de iniciação da tradução e estão envolvidos na classificação e armazenamento de mRNAs, enquanto os *P-bodies* são definidos como locais de armazenamento e/ou degradação de vários transcritos formados e compostos por proteínas repressoras de tradução e componentes da maquinaria de degradação de mRNA (SHETH, U. & PARKER, R., 2003; TEIXEIRA, D. et al., 2005; HOLETZ, F. B. et al., 2007; ANDERSON, P. & KEDERSHA, N., 2008; KEDERSHA, N. & ANDERSON, P., 2009).

Nesse contexto, a possibilidade de que a proteína CSB de *T. cruzi* migre juntamente a possíveis grânulos de estresse, exige então que TcCSB faça interações proteína-proteína que vão além das conexões canônicas já descritas para o reparo acoplado a transcrição e seu papel para a via de sinalização a danos ao DNA. Assim, sugerimos que TcCSB possivelmente faça interações com proteínas constituintes dos grânulos de estresse que ainda não são conhecidas nesse parasito. Por outro lado, o interactoma de CSB em células humanas após UV foi descrito em 2015, utilizando a tecnologia de purificação de afinidade em tandem (TAP) que possibilitou ensaios de co-immunoprecipitação associados espectrometria de massa para identificar e caracterizar as proteínas que potencialmente interagem com o CSB-TAP. Como descrito por Serena

Nicolai et al. (2015), a abordagem revelou 33 proteínas que não eram conhecidas anteriormente por interagir com CSB. As novas proteínas pertencentes ao interactoma de CSB vão além da interação estabelecida de CSB com RNA pol II. A associação de CSB foi encontrada com cinco grupos de proteínas principais. Mais de 40% dessas proteínas demonstraram funções tanto em aspectos gerais de processamento de RNA quanto em processos de *pré-splicing* de RNA.

Nesse âmbito, destaca-se a interação de CSB com proteínas que são fatores de processamento do pré-mRNA PRP8, PRPF4, PRPF3 e CSTF1 que é um dos vários fatores requeridos para a poliadenilação e clivagem da extremidade 3'. Ademais, além dos fatores de transcrição e de processamento do mRNA, o estudo também revelou as interações com Topoisomerasas I e II, bem como XRCC5 como proteínas co-purificadas com CSB-TAP. Coletivamente, o estudo revelou uma série de novas proteínas co-purificadas com CSB envolvidas no metabolismo do RNA, remodelação da cromatina (GATAD2A; RBP4), reparo de DSB (XRCC5), proteassoma (PSMD3,12; PSMC5; USP7). Embora estudos anteriores tenham estabelecido um papel para o CSB no reparo de DNA para o TC-NER estas proteínas identificadas indicam papéis potenciais para CSB no metabolismo de RNA envolvendo repressão e ativação do processo de transcrição, *pré-splicing* e integridade e remodelamento da cromatina (NICOLAI, S. et al., 2015).

Assim, as informações anteriores fortalecem as nossas evidências vindouras da análise de cinética de CSB em *T. cruzi*, após irradiação UV, de modo que, caso ocorra nesse parasito às interações proteína-proteína descritas anteriormente para células de outros eucariotos isso representaria como TcCSB atua desde o reparo de DNA acoplado a transcrição, até a etapa de controle de qualidade de mRNAs. Ou seja, TcCSB poderia estar auxiliando na resolução de mRNAs oligocistrônicos não editados oriundos de danos causados durante a transcrição que se acumulam e migram em grânulos do núcleo ao citoplasma, após UV. Em *T. cruzi*, o surgimento desses grânulos após UV pode ser justificado como uma adaptação à perda do controle transcricional. No entanto, questionamos se é possível um mRNA policistrônico não processado (*unspliced*) deixar o núcleo e alcançar o citoplasma? Desse modo, a partir de agora discutiremos trabalhos que trazem várias descobertas que têm emergido no cenário aqui proposto, em especial para os tripanossomatídeos.

Primeiramente, falaremos do complexo de degradação que marca os mRNAs defeituosos para degradação pelo exossoma nuclear, denominado complexo TRAMP (Mex67/Mtr2), (SCHMIDT, K. & BUTLER, J.S., 2013). O controle de qualidade envolve processo de marcar o mRNA corretamente processado utilizando um conjunto de proteínas adaptadoras de transporte, frequentemente proteínas ricas em serina arginina (SR), que então recrutam o complexo de receptor de exportação nuclear e assim sinalizam o mRNA como competente para exportação. A competência de exportação de cada ribonucleoproteína mensageira (mRNP) é posteriormente controlada no local de entrada do poro nuclear (*The nuclear basket*). Desse modo, a transcrição e a exportação nuclear estão estreitamente conectadas pelo complexo de transcrição/exportação (TREX), (BONNET, A. & PALANCADE, B., 2015). No entanto, embora as modificações das proteínas mRNP possam desempenhar um papel, ainda não está claro como os mRNAs defeituosos são distinguidos dos intactos (HUANG, Y., et al. 2004).

Em tripanossomatídeos há um complexo TRAMP-like e um exossoma nuclear que degrada RNAs não processados adequadamente por *trans-splicing* (KRAMER, S., et al. 2016), e estariam envolvidos com a via de exportação usando o receptor Mex67/Mtr2, (SCHWEDE, A., et al. 2009; DOSTALOVA, A., et al. 2013). Apesar da presença deste heterodímero que corresponde ao receptor principal de exportação, algumas outras descritas em outros organismos e que atuam como adaptadores para exportação e formação do poro nuclear (*The nuclear basket*) ainda não foram identificados em tripanossomatídeos, como o caso das proteínas do complexo TREX permanecem controverso nesse organismo (OBADO, S.O., et al. 2017). Além do mais, tripanossomatídeos possuem uma estrutura de poro nuclear muito distinta e que em grande parte carece a assimetria usual de componentes de poros nucleares vistos em Opisthokonts (OBADO, S.O., et al. 2017; OBADO, S.O., et al. 2016).

O trabalho de Carina Goos e colaboradores em 2019 somam as evidências anteriores no contexto do qual o controle via exossoma nuclear é distinto nos tripanossomatídeos. Uma vez que seus resultados em *T. brucei* descrevem que é possível observar que mRNAs não processados e policistrônicos (*unspliced*) pode alcançar o citoplasma, utilizando a técnica *intra-molecular multi-colour single molecule fluorescence in situ hybridization* (smFISH) para examinar a exportação nuclear de

transcritos intactos e não processados (*unspliced*). Os resultados demonstram que, a exportação nuclear pode começar co-transcricionalmente e portanto, na ausência de *splicing*. Isso foi demonstrado pela utilização de uma sonda intergênica entre os genes beta-tubulina e alfa-tubulina por sm-FISH, confirmando a presença de mRNA dicistrônico presente no citoplasma, apesar de 2/3 dos dicistrons ainda permanecerem no núcleo. No entanto, algum controle deve estar presente, desde que a concentração de mRNA da tubulina não processado (*unspliced*) pode ser até oito vezes maior no núcleo do que no citoplasma, como também por transcritos policistrônicos que se acumulam no citoplasma durante a depleção do exossoma nuclear via RNAi. Ademais sua formação é dependente do processo de transcrição ativa e da integridade nuclear (KRAMER, S. et al., 2012). Também já foi descrito em tripanossomatídeos que grânulos periféricos nucleares (NPGs) são o resultado de um processo de exportação nuclear e contêm parte de mRNAs não editados (marcados com um conjunto padrão de proteínas de ligação de RNA) presos no poro, indicando um mecanismo de controle de exportação nuclear que atua durante a exportação de transcritos defeituosos através do poro nuclear e não pelo nucleoplasma (GOOS, C. et al., 2019; KRAMER, S. et al., 2012).

Como mencionado, a competência de exportação de cada ribonucleoproteína mensageira (mRNP) é posteriormente controlada no local de entrada do poro nuclear (*The nuclear basket*), (BONNET, A. & PALANCADE, B., 2015). Os complexos de poros nucleares (NPCs) atuam como portas de entrada entre os compartimentos nuclear e citoplasmático e seus componentes acoplam a produção e a exportação de mRNA e assim evitam a saída de mRNAs não processados do núcleo. Nesse contexto, atuam os *The Vaults (barrel-shaped cytoplasmic vault structure)* que são organelas associadas aos complexos de poros nucleares (NPCs) e têm sido implicados em funções celulares, incluindo transporte nuclear citoplasmático, localização de mRNA, resistência a drogas, sinalização celular, montagem de poros nucleares. Os vtRNAs são transcritos pela RNA polimerase III e variam de 80 a 140 nt, (STADLER, P. F., 2009). Cada vtRNA forma uma partícula de RNA estável com a proteína TEP1 e RNPs constituindo o *The Vault*, com funções nos processos de transporte núcleo-citoplasmático de RNA, localização e processamento endonucleolítico de mRNAs (KICKHOEFER, V. A., 1999; PODERYCKI, M. J., 2005). Os *vaults* são similares a outro grupo de RNAs não codificadores descritos como RNAs Y e que têm demonstrado participar do

processamento e controle de qualidade de RNAs recém-sintetizados (WURTMANN, E. J., & WOLIN, S. L., 2010).

Em *T. brucei*, em 2019, foi relatado a descoberta dos *vault* RNAs (vtRNAs) que são pequenos RNAs não codificadores, identificados como componentes similares ao da organela descrita em eucariotos. Os níveis de vtRNA sob regulação negativa (*down-regulated*) prejudicam a produção de mRNA *trans-spliced*, consistente com um papel do vtRNA no metabolismo do mRNA de *T. brucei*. Assim, os autores concluíram que, essa espécie de RNA modula o metabolismo de várias classes de RNA ao interagir com seus parceiros de ligação a proteínas TEP1 e Ro (KOLEV, N. G. et al 2019). A caracterização de TBsRNA-10 revelou por Chip-seq a presença dos elementos promotores externos, *A-box* e *B-box* a montante do gene, similar ao observado para outros vtRNAs, além da presença de uma cauda oligo(T) na porção 3' dos genes vtRNAs que foram identificados pelo método de enriquecimento de fragmentos de DNA *cross-linked* com polIII. Assim, os vtRNAs de *T. brucei* são transcritos pela polimerase III, como descrito para outros eucariotos e possuem os elementos reguladores característicos dos vtRNAs, (KOLEV, N G., et al. 2019).

Em *T. brucei*, têm se encontrado os pequenos RNAs não codificantes em *foci* extra nucleolar em conjunto com RNPs formando os NPGs envolvidos no processamento endonucleolítico de RNAs, em contraste com o descrito primeiramente para a localização citoplasmática dos vtRNAs em mamíferos (LIANG, X. H., et al. 2005; MICHAELI, S., et al, 2012). Há a possibilidade de que em *T. brucei* o vtRNA tem um papel importante na maturação de mRNA, uma vez que esse está envolvido na estabilização da porção SL da extremidade 5' do RNA recém-sintetizado, caso sejam direcionados para degradação por TEP1. Esse papel regulador negativo para o vtRNA na modulação de TEP1 é apoiada pela observação de que a abundância de vtRNA é mais alta em células quiescentes, que tem capacidade biossintética de RNA limitada (KOLEV, N G., et al. 2019).

Em consonância com TEP1, atua a proteína CRK9, uma quinase ciclina dependente a qual é essencial para o processamento de pré-mRNA do parasito. O silenciamento de CRK9 causa um declínio de mRNAs maduros e leva ao aumento concomitante de pré-mRNAs não processados (*unspliced*) podendo levar a formação de

NPGs e o desaparecimento do intermediário de estrutura Y de *trans-splicing*, que é essencial para a primeira etapa de *splicing* (GOSAVI, U. et al., 2020). Desse modo, esses resultados em *T. brucei* podem ilustrar os possíveis caminhos o qual se dá a sinalização e formação dos grânulos para a exportação de mRNA não processados do núcleo ao citoplasmática em *T. cruzi*. Uma vez que, as correlações entre os vtRNAs e as proteínas TEP1 e CRK9 ainda não são conhecidas nesse parasito.

Em *T. cruzi*, algumas proteínas têm emergido nesse contexto da formação de grânulos perinucleares relacionados ao controle pós-translacional. Assim, destacamos a proteína TcXRNA, a proteína homóloga à Xrn1 de leveduras (COSTA, J. F. et al., 2018a). A TcXRNA exibe localização citoplasmática granular, sendo expressa constitutivamente ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, e se acumula na periferia nuclear quando o processamento do mRNA é inibido. TcXRNA não se co-localiza com os grânulos de TcDHH1 e TcCAF1 no citoplasma. Por outro lado, a co-localização de TcXRNA com grânulos distintos de mRNP ocorre principalmente ao redor do núcleo, o que sugere a existência de um *checkpoint* de controle de qualidade de mRNA na periferia nuclear, envolvendo a atividade de proteínas distintas, como TcXRNA, TcDHH1 e TcCAF1 (COSTA, J. F. et al., 2018a). Desse modo, esses achados corroboram para a interpretação de que o surgimento de mRNAs não processados possivelmente pela parada de transcrição colapsada por danos gerados por UV em *T. cruzi*, poderia levar a formação dos grânulos com localização perinuclear contendo parte de mRNAs não editados.

No entanto, ainda não se sabe como os mRNAs oligocistrônicos imaturos são distinguidos na célula e selecionados para a exportação e reconhecidos pelos sistemas de exportação núcleo citoplasmático. Esta questão não foi respondida para mRNAs contendo *introns* de quaisquer eucariotos (KILCHERT, C. et al., 2016), e essa lacuna do conhecimento se torna uma questão importante a ser respondida e em especial para os tripanossomatídeos, uma vez que, nesses organismos o acúmulo de mRNAs dicistrônicos não editados vindouros de danos causados durante a produção do transcrito se tornar um problema para a célula. Nesse contexto, Susanne Kramer e colaboradores (2016) propõem dois cenários: os alvos de RNA podem ser especificamente reconhecidos pelo exossomo por meio de um fator de especificidade de exossomo específico (ESF) ainda desconhecido, que marca a molécula como não editada

(*unspliced*), ou pela função de alguma proteína desconhecida que direciona o transcrito problemático ao exossomo (KRAMER, S. et al., 2016).

Assim, contemplado essa teoria, levantamos a seguinte questão em *T. cruzi*: A proteína CSB é responsável por direcionar o transcrito não processado ao exossomo? Os nossos resultados da análise da cinética de distribuição da proteína CSB em *T. cruzi* após irradiação UV sugerem que TcCSB atua desde o reparo de DNA acoplado a transcrição, até a resolução de mRNAs dicistrônicos vindouros de danos causados durante a produção do transcrito que se acumulam e migram em grânulos do núcleo ao citoplasma. Desse modo, sugerimos que a proteína CSB de *T. cruzi* possa migrar junto a esses mRNAs defeituoso truncados direcionando-os em conjunto com RBPs em *foci* granulares para o reparo, degradação ou silenciamento dos transcritos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram às possíveis interações proteína-proteína que decorrem dos mecanismos moleculares da via de sinalização à resposta a danos ao DNA relacionadas com o reparo acoplado à transcrição em *T. cruzi*. E denotam a importância dos estudos dos papéis das proteínas TcCSB, TcRPA, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A que influenciam a sobrevivência da célula após irradiação UV. Assim, sugerimos que essas atuam em regiões de conflitos vindouros da formação de *R-loops*. Esses, originários de uma estrutura colapsada onde se encontra a fita de RNA recém-sintetizada pareada à fita de DNA molde, juntamente à RNA Pol II na etapa da inicialização da síntese do transcrito policistrônico.

Ademais, danos gerados por UV podem estar correlacionados a formação de transcrito dicistrônico que surgem da parada da etapa de elongação da RNA Pol II em locais de danos. Nossos dados dão origem a uma hipótese em que mRNA não processados podem ser marcados pela proteína CSB em *T. cruzi* a fim de direcioná-los as próximas etapas do controle pós-translacional, uma vez que, essa proteína migra do núcleo ao citoplasma em *foci* granular em células irradiadas com UV. Esse trabalho consubstancia como o parasito resolve os danos ao DNA que acometem a transcrição através da ação de TcCSB para a ativação da via de sinalização para o reparo acoplado a transcrição em consonância com a ativação da via de resposta a danos ao DNA com a ação cooperativa entre TcRPA, TcRNaseH1 e TcRNaseH2A na resolução de *R-loops* de modo a orquestrar a uma sinalização celular que influa para a sobrevivência e resiliência de *T. cruzi* ao estresse genotóxico transcricional.

7. REFERÊNCIAS

AIBARA, S., VALKOV, E., LAMERS, M., AND STEWART, M. (2015). Domain organization within the nuclear export factor Mex67:Mtr2 generates an extended mRNA binding surface. *Nucleic Acids Res.* 43, 1927–1936. doi: 10.1093/nar/gkv030

ALTCLAS, J.; ARSELÁN, S.; BARCÁN, L.; DIEZ, M.; GADANO, A.; JACOB, N.; MAIOLO, E.; NAGEL, C.; RIARTE, A.; RODRIGUEZ, V.; SCHIAVELLI, R.; SCHIJMAN, A.G.; VIGLIANO, C.; LATTES, R.; CASADEI, D (2010). Chagas' disease and Solid Organ Transplantation. *Transplantation Proceedings*, v.42, n.9, p.3354–3359, 2010.

ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215 (3),p. 403–410, 1990.

ALTUN, M.; HOLGER B. KRAMER; et al. Activity-Based Chemical Proteomics Accelerates Inhibitor Development for Deubiquitylating Enzymes. *Chemistry & Biology* 18, 1401–1412, November 23, 2011.

ALVES, C.L.; REPOLÊS, B.M.; DA SILVA, M.S.; MENDES, I.C.; MARIN, P.A.; AGUIAR, P.H.N.; SANTOS, S.S.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; ANDRADE, L.O.; GUARNERI, A.A.; TAHARA, E.B.; ELIAS, M.C.; MACHADO, C.R. (2018). The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. *Scientific Reports*, v.8, n.1, p. 1-12, setembro de 2018.

ANDERSON, P., AND KEDERSHA, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33, 141–150. doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003

ANDRADE-LIMA, L. C. et al., DNA repair and recovery of RNA synthesis following exposure to ultraviolet light are delayed in long genes. 2744–2756 *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, No. 5. 2015.

ANDRÉ, KÉVIN. M.; ELIET H. SIPOS, AND JULIE SOUTOURINA1- Mediator Roles Going Beyond Transcription.. *Trends in Genetics*, Month 2020. TIGS 1724 No. of Pages 11.

ANINDYA, R. et al. A Ubiquitin-Binding Domain in Cockayne Syndrome B Required for Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair. *Mol Cell*. 2010 June 11; 38(5): 637–648. 2010.

ARAKI, M., MASUTANI, C., TAKEMURA, M., UCHIDA, A., SUGASAWA, K., KONDOH, J., et al. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276: 18665–18672. 2001.

ARNER, E.; KINDLUND, E.; NILSSON, D.; FARZANA, F.; FERELLA, M.; TAMMI, M.T.; ANDERSSON, B. Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20,000 additional gene variants. *BMC Genom*. 2007, 8, 391. [CrossRef]

AUGUSTO-PINTO, L., TEIXEIRA, S. M., PENA, S. D. & MACHADO, C. R. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, 164, 117-26. 2003.

ASSIS, A. Lesões no DNA nuclear e mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* sinalizam para diferentes tipos de morte. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

BADJATIA N, AMBROSIO DL, LEE JH, GUNZL A. 2013. Trypanosome cdc2-related kinase 9 controls spliced leader RNA cap4 methylation and phosphorylation of RNA polymerase II subunit RPB1. *Mol. Cell. Biol*. 33, 1965–1975.

BADJATIA, N., NGUYEN, T.N., LEE, J.H., GUNZL, A. *Trypanosoma brucei* harbors a divergent XPB helicase paralog that is specialized in nucleotide excision repair and conserved among kinetoplastid organisms. *Mol Microbiol* 90: 1293–1308. 2013.

BALAJEE, A. D., et al. Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 4306–4311, April 1997. *Biochemistry*.

BARR, M. S. et al. ATR Kinase Activity Regulates the Intranuclear Translocation of ATR and RPA following Ionizing Radiation. *Current Biology*, Vol. 13, 1047–1051, June 17, 2003. DOI 10.1016/S0960-9822(03)00376-2

BÉLANGER, F. et al., Mutations in Replicative Stress Response Pathways Are Associated with S Phase-specific Defects in Nucleotide Excision Repair. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 291, 522–537, January 8, 2016.

BELOTSEKOVSKII, P. B. et al. R-loop generation during transcription: Formation, processing and cellular. Outcomes. *DNA Repair* 7; 69–81. 2018

BERN, C. (2015) Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 373 (5), 456–466.

BERNÁ, L.; PITA, S.; CHIRIBAO, M.L.; PARODI-TALICE, A.; ALVAREZ-VALIN, F.; ROBELLO, C. Biology of the *Trypanosoma cruzi* Genome. In *Biology of Trypanosoma cruzi*; IntechOpen: London, UK, 2019. [CrossRef]

BERNÁ, L.; RODRIGUEZ, M.; CHIRIBAO, M.L.; PARODI-TALICE, A.; PITA, S.; RIJO, G.; ALVAREZ-VALIN, F.; ROBELLO, C. Expanding an expanded genome: Long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb. Genom.* 2018, 4. [CrossRef]

BERRIMAN, M., *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309, 416-22. 2005.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D.C.; LENNARD, N.J.; CALER, E.; HAMLIN, N.E.; HAAS, B.; ET AL. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005, 309, 416–422. [CrossRef] [PubMed]

BINZ, SARA & MARC S WOLD. Regulatory Functions of the N-terminal Domain of the 70-kDa subunit of Replication Protein A (RPA). May 2008 *Journal of Biological Chemistry* 283(31):21559-70 Follow journal. DOI: 10.1074/jbc.M802450200.

BJÖRK, P., AND WIESLANDER, L. (2017). Integration of mRNP formation and export. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2875–2897. doi: 10.1007/s00018-017-2503-3.

BOEHM V, GEHRING NH. 2016. Exon junction complexes: supervising the gene expression assembly line. *Trends Genet.* 32, 724–735.

BOEING, S. ET AL. (2016) Multiomic analysis of the UV-induced DNA damage response. *Cell Rep.* 15, 1597–1610

BONNET,A. AND PALANCADE,B. (2015) Intron or no intron: a matter for nuclear pore complexes. *Nucleus*, 6, 455–461.

BRANZEI D, FOIANI M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):297-308. 2008.

BREGEON, D., & DOETSCH, P.W. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nat Rev Cancer* 11: 218–227. 2011.

BRENER, Z.; CHIARI, E. (1963). Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.5, p.220-224, outubro de 1963.

BRIGGS E, CROUCH K, LEMGRUBER L, LAPSLEY C, MCCULLOCH R (2018) Ribonuclease H1-targeted R-loops in surface antigen gene expression sites can direct trypanosome immune evasion. *PLoS Genet* 14(12): e1007729. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007729>BRIGGS, 2019

BRIGGS, E; CROUCH, K; LEMGRUBER, L; HAMILTON, G; LAPSLEY, C; McCULLOCH, R. *Trypanosoma brucei* ribonuclease H2A is an essential R-loop processing enzyme whose loss causes DNA damage during transcription initiation and antigenic variation. *Nucleic Acids Research*, 2019. doi: 10.1093/nar/gkz644. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31350892>>. Acesso em 24 de março de 2020.

BRISSE, S., BARNABE, C. & TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*, 30, 35-44. 2000.

BROWN, J.S. & S.P. JACKSON. Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response. *Open Biol*, 2015.

BURLE-CALDAS, GABRIELA.; MELISSA, SOARES-SIMÕESA; LAIANE LEMOS-PECHNICKIB; WANDERSON DUARTEDARROCHA; SANTUZA M.R.TEIXEIRAA. Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *International Journal for Parasitology*. Volume 48, Issue 8, July 2018, Pages 591-596

BUSCAGLIA, C. A. & DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*, 5, 419-27. 2003.

CLAYTON, C.E., A.M. ESTEVEZ, The exosomes of trypanosomes and other protists, *Adv. Exp. Med. Biol.* 702 (2010) 39–49.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F.; GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi* Strain Bug2148. *Genome Announc.* 2018, 6. [CrossRef] [PubMed]

CAMACHO, E.; GONZÁLEZ-DE LA FUENTE, S.; RASTROJO, A.; PEIRÓ-PASTOR, R.; SOLANA, J.C.; TABERA, L.; GAMARRO, F.; CARRASCO-RAMIRO, F.; REQUENA, J.M.; AGUADO, B. Complete assembly of the *Leishmania donovani* (HU3 strain) genome and transcriptome annotation. *Sci. Rep.* 2019, 9, 6127. [CrossRef] [PubMed]

CAMERONI, E., STETTLER, K., & SUTER, B. On the traces of XPD: cell cycle matters untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations. *Cell Div* 5: 24. 2010.

CAMPOS PC, BARTHOLOMEU DC, DAROCHA WD, CERQUEIRA GC, TEIXEIRA SM. 2008 Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 38, 1383–1389.

CARDOSO J, LIMA CDP, LEAL T, GRADIA DF, FRAGOSO SP, et al. Analysis of Proteasomal Proteolysis during the In Vitro Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi*. PLoS ONE 6(6): 2011.

CERQUEIRA, P. et al. Parasitology Effect of ionizing radiation exposure on *Trypanosoma cruzi* ubiquitin-proteasome system. Volume 6, Issue 6. June 2011.

CHAGAS, C. Chagas, nova tripanozomiaze humana, estudos sobre a morfologia e o clico evolutivo do Schizotrypanum cruzi. , p.70. 1909.

CHAME, D. F. Caracterização das ribonucleoproteínas DRBD3 e ALBA30 de *Trypanosoma cruzi* e seus envoltimentos na resposta ao estresse. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

CHATELAIN, E. (2014). Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. Journal of Biomolecular Screening, v.20, n.1, p. 22-35, agosto de 2014.

CHEN, X. et al., Kinetic gating mechanism of DNA damage recognition by Rad4/XPC. *Nature Communications*, 6, Article number: 5849. 2015.

CHEN, Z.J. & L.J. SUN. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 33(3): p. 275-86, 2009.

CHITALE, S. & RICHLI, H. Timing of DNA lesion recognition: Ubiquitin signaling in the NER pathway. *Cell Cycle*. ISSN: 1538-4101 (Print) 1551-4005 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kccy20> , 2017.

CHU, G., & CHANG, E. Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 242: 564–567. 1988.

CICCIA A, & ELLEDGE SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*; 40:179-204. 2010.

CLAGUE, M.J., AND J.M. COULSON; S. URBE. Cellular functions of the DUBs. *J Cell Sci.* 125(Pt 2): p. 277-86, 2012.

CLAYTON C, MICHAELI S. 2011. 3' processing in protists. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 247–255.

CLAYTON C. 2016. Gene expression in Kinetoplastids. *Curr. Opinion Microbiol.* 32, 46–51.

CLAYTON C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol.* 9: 190072. 2019. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.190072>. 2019

CLÉRY, A., AND FRÉDÉRIC, H.-T. A. (2012). From Structure to Function of RNA Binding Domains. Austin, TX: Landes Bioscience, 137–158.

CLÉRY, A., BLATTER, M., AND ALLAIN, F. H. T. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 290–298. doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.002

COIN, F., OKSENYCH, V., MOCQUET, V., GROH, S., BLATTNER, C., AND EGLY, J.M. Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol Cell* 31: 9–20. 2008.

COMPE, E., AND EGLY, J.M. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 343–354. 2012.

CORTEZ D. Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling. *Genes Dev.* May 1; 19(9):1007–12. PMID: 15879550, 2005.

COSTA, J. F., FERRARINI, M. G., NARDELLI, S. C., GOLDENBERG, S., ÁVILA, A. R., AND HOLETZ, F. B. (2018A). Trypanosoma cruzi XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 113:e170531. doi: 10.1590/0074-02760170531

DA COSTA LIMA T, MOURA D, REIS C, VASCONCELOS J, ELLIS L, CARRINGTON M, FIGUEIREDO R, DE MELO NETO O. 2010. Functional characterization of three Leishmania poly(A) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryot. Cell* 9, 1484–1494.

DA-SILVA, S. M. et al. Transcription activity contributes to the firing of non-constitutive origins in African trypanosomes helping to maintain robustness in S-phase duration. *Scientific Reports* (2019) 9:18512 / doi.org/10.1038/s41598-019-54366-w

DANIELS, J.P., GULL, K., AND WICKSTEAD, B. Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 552–569. 2010.

DaROCHA, W.D., SILVA, R.A., BARTHOLOMEU, D.C., PIRES, S.F., FREITAS, J.M., MACEDO, A.M., et al., Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92, 113–120. 2004b.

DAS A, BANDAY M, BELLOFATTO V. 2008 RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. *Eukaryot. Cell* 7, 429–434

DAS A, ZHANG Q, PALENCHAR JB, CHATTERJEE B, CROSS GA, BELLOFATTO V. 2005 Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to

DE BOER, J. G. Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat Res*, 509, 201-10. 2002.

DE FREITAS, J. M., AUGUSTO-PINTO, L., PIMENTA, J. R., BASTOS-RODRIGUES, L., GONCALVES, V. F., TEIXEIRA, S. M., et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, 2, e24. 2006.

DE LANGE T, LIU A, VAN DER PLOEG L, BORST P, TROMP M, VAN BOOM J. 1983. Tandem repetition of the 5 mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription. *Cell*, 34, 891–900.

DE LANGE T, MICHELS PA, VEERMAN HJ, CORNELISSEN AW, BORST P. 1984 Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence. *Nucleic Acids Res.* 12, 3777–3790.

DE SOUZA, WANDERLEY. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. Volume 8 , Issue 4 , 2002

DEMING, P. B., FLORES, K. G., DOWNES, C. S., PAULES, R. S. & KAUFMANN, W. K. ATR enforces the topoisomerase II-dependent G2 checkpoint through inhibition of Plk1 kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 36832–36838, 2002.

DÍAZ-VIRAQUÉ, F.; PITA, S.; GREIF, G.; DE SOUZA, R.C.M.; IRAOLA, G.; ROBELLO, C. Nanopore Sequencing Significantly Improves Genome Assembly of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *Genome Biol. Evol.* 2019, 11, 1952–1957. [CrossRef] [PubMed]

DIEGO, J. L., KATZ JM, MARSHALL P, GUTIERREZ B, MANNING JE, et al. The ubiquitin proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 40: 1053–1062. 2001.

DILLON LA ET AL. 2015 Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. *Nucleic Acids Res.* 43, 6799–6813. direct spliced-leader RNA gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7314–7322.

DOSSIN & SCHENKMAN, Actively Transcribing RNA Polymerase II Concentrates on Spliced Leader Genes in the Nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryotic Cell*, May 2005, p. 960–970 Vol. 4, No. 5. 2005.

DOSTALOVA A, KASER S, CRISTODERO M, SCHIMANSKI B. 2013. The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. *Mol. Microbiol.* 88, 728–73

DOSTALOVA,A., KÄSER,S., CRISTODERO,M. AND SCHIMANSKI,B. (2013) The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. *Mol. Microbiol.*, 88,728–739.

DYE, B.T. & B.A. SCHULMAN. Structural mechanisms underlying posttranslational Eliseeva IA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP. 2013. Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)* 78, 1377–1391.

EL-SAYED, N.M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309 (5733), pp.409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>_Accessed May 23, 2014.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E.A.; HERTZ-FOWLER, C.; ET AL. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005, 309, 404–409. [CrossRef]

ELISEEVA, I. A.; LYABIN, D. N.; OVCHINNIKOV L, P. Poly(A)-Binding Proteins: Structure, Domain Organization, and Activity Regulation. *Biochemistry. Mosc., New York*, v. 78, n. 13, p. 1377-1391. 2013.

EMMERT, S., UEDA, T., ZUMSTEG, U., WEBER, P., KHAN, S.G., OH, K.S., *et al.* Strict sun protection results in minimal skin changes in a patient with xeroderma pigmentosum and a novel c.2009delG mutation in XPD (ERCC2). *Exp Dermatol* 18: 64–68. 2009.

EYBOULET, F. et al. (2013) Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev.* 27, 2549–2562

FADDA A, RYTEN M, DROLL D, ROJAS F, FAÄRBER V, HAANSTRA J, BAKKER B, MATTHEWS K, CLAYTON C. 2014. Transcriptome-wide analysis of mRNA decay reveals complex degradation kinetics and suggests a role for co-transcriptional degradation in determining mRNA levels. *Mol. Microbiol.* 94, 307–326

FAGBEMI, A.F., ORELLI, B., AND SCHARER, O.D. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 10: 722–729. 2011.

FANNING, E; KLIMOVICH, V; NAGER, A, R. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(15):4126–4137. doi:10.1093/nar/gkl550

FELDBERG, R.S., & GROSSMAN, L. A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA. *Biochemistry* 15: 2402–2408. 1976.

FERNANDEZ-MOYA SM, CARRINGTON M, ESTEVEZ AM. 2014. Depletion of the RNA-binding protein RBP33 results in increased expression of silenced RNA polymerase II transcripts in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* 9, e107608.

FISCHER, E.S., et al., *The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation.* *Cell*, 147(5): p. 1024-39. 2011.

FRANCHITTO, A., OSHIMA, J. & PICHIERRI, P. The G2-phase decatenation checkpoint is defective in Werner syndrome cells. *Cancer Res.* 63, 3289–3295, 2003.

GARCIA, J. B. F., VIEIRA-DA-ROCHA, J. P . COSTA-SILVA, H. M. ALVES, C. A. MACHADO, C. R., CRUZ, A. K. *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* present distinct DNA damage responses. *Molecular & Biochemical Parasitology.* PII: S0166-6851(16)30055-X; DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.molbiopara.2016.05.004>. Reference: MOLBIO 10981. 2016.

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I.A.; STOTHARD, J.R.; CARRASCO, H.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.J.; ACOSTA, N.; ARIAS, A.R.; MILES, M.A. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, v.421, p.936-939, fevereiro de 2003.

GEORGES, A. et al. (2019) Functional interplay between Mediator and RNA polymerase II in Rad2/XPG loading to the chromatin. *Nucleic Acids Res.* 47, 8988–9004

GERSTBERGER, S., HAFNER, M., AND TUSCHL, T. (2014). A census of human RNA binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* 15, 829–845. doi: 10.1038/nrg3813

GILL, E. E. & FAST, N. M. Stripped-down DNA repair in a highly reduced parasite. *BMC Mol Biol*, 8, 24. 2007.

GLISOVIC, T., BACHORIK, J. L., YONG, J., AND DREYFUSS, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582, 1977–1986. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.004.

GOOS, C. MARIO DEJUNG², ANN M. WEHMAN³, ELISABETH M-NATUS¹, JOHANNES SCHMIDT¹, Trypanosomes can initiate nuclear export co-transcriptionally. *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, No. 1. 2019.

GOSAVI, UJWALA, ; ANKITA SRIVASTAVA, NITIKA BADJATIA, ARTHUR GÜNZL. Rapid block of pre-mRNA splicing by chemical inhibition of analog-sensitive CRK9 in *Trypanosoma brucei*. 2020; 113:1225–1239. DOI: 10.1111/mmi.14489.

GRANDIN & CHARBONNEAU. RPA provides checkpoint-independent cell cycle arrest and prevents recombination at uncapped telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 1;12(3):212-26, 2013.

GROISMAN, R. CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin–proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *GENES & DEVELOPMENT* 20:1429–1434. 2006 b

HAILE S, CRISTODERO M, CLAYTON C, ESTE´VEZ A. 2007. The subcellular localisation of trypanosome RRP6 and its association with the exosome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151, 52–58.

HAMPERL, S., M.J. BOCEK, J.C. SALDIVAR, T. SWIGUT, K.A. CIMPRICH. Transcription replication conflict orientation modulates R-loop levels and activates distinct DNA damage responses, *Cell*; 170 774–786 e719. 2017.

HANAWALT, P.C., AND SPIVAK, G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 958–970. 2008.

HE, J., et al., Ubiquitin-specific protease 7 regulates nucleotide excision repair through deubiquitinating XPC protein and preventing XPC protein from undergoing ultraviolet light-induced and VCP/p97 protein-regulated proteolysis. *J Biol Chem.* 289(39): 27278–89. 2014.

HERREROS-CABELLO, A. Et al., Trypanosoma cruzi Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes* 2020, 11, 1196; doi:10.3390/genes11101196.

HIRAIWA, M. P., AGUIAR, M. A., AVILA, R. A. Fluorescence-Based Assay for Accurate Measurement of Transcriptional Activity in Trypanosomatid Parasites. *Cytometry Part A*; 93A: 727–736, 2018.

HOEIJMAKERS, JAN. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. In: *Nature*. pp. 366-374. 2001.

HOLETZ, F. B., ALVES, L. R., PROBST, C. M., DALLAGIOVANNA, B., MARCHINI, F. K., MANQUE, P., et al. (2010). Protein and mRNA content of TcDHH1- containing mRNPs in Trypanosoma cruzi. *FEBS J.* 277, 3415–3426. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07747

HOLETZ, F. B., CORREA, A., AVILA, A. R., NAKAMURA, C. V., KRIEGER, M. A., AND GOLDENBERG, S. (2007). Evidence of P-body-like structures in Trypanosoma cruzi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 1062–1067. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.104

HORN D. 2014 Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 123–129.

HUANG, J. & VAN DER PLOEG, L. H. T., Maturation of Polycistronic Pre-mRNA in Trypanosoma brucei: Analysis of trans Splicing and Poly(A) Addition at Nascent RNA

Transcripts from the hsp70 Locus. *Molecular and cellular biology*, june 1991, p. 3180-3190. 1991

HUANG, J. et al. CCDC134 interacts with hADA2a and functions as a regulator of hADA2a in acetyltransferase activity, DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest. *Histochem Cell Biol*, (1):41-55, 2012.

HUANG, Y., YARIO, T.A. AND STEITZ, J.A. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 9666–9670

IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M.-A.; ADLEM, E.; AERT, R.; et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005, 309, 436–442. [CrossRef] [PubMed]

IYAMA, T & WILSON, D. Elements that Regulate the DNA Damage Response of Proteins Defective in Cockayne Syndrome. Teruaki Iyama and David M. Wilson. *J Mol Biol*. 2016 January 16; 428(1): 62–78. doi:10.1016/j.jmb.2015.11.020; 2016.

JANKOVIC, M. Antigen receptor diversification and chromosome translocations.” In: *Nat Immunol*. 8(8), pp. 801-8. 2007.

JIMÉNEZ, P.; JAIMES, J.; POVEDA, C.; RAMÍREZ, J.D. (2018). A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, v.146, n.3, p.269-283, julho de 2018.

KEDERSHA, N., AND ANDERSON, P. (2009). Chapter 4 regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 90, 155–185. doi: 10.1016/S1877-1173(09)90004-7

KEE, Y. & HUANG, T. T. Role of Deubiquitinating Enzymes in DNA Repair. *Mol Cell Biol*. 2015 Dec 7;36(4):524-44. Print 2016.

KICKHOEFER, V. A., STEPHEN, A. G., HARRINGTON, L., ROBINSON, M. O., AND ROME, L. H. (1999) Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J. Biol. Chem.* 274, 32712–32717.

KILCHERT, C. S. WITTMANN, L. Vasiljeva, The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2015.15>.

KOCH H, RAABE M, URLAUB H, BINDEREIF A, PREUSSER C. 2016. The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: characterization of the functional poly(A) polymerase. *RNA Biol.* 13, 221–231.

KOLEV N, FRANKLIN J, CARMİ S, SHI H, MICHAELI S, TSCHUDI C. 2010. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. *PLoS Pathog.* 6, e1001090.

KOLEV, N. G. et al., The vault RNA of *Trypanosoma brucei* plays a role in the production of trans-spliced mRNA. *J. Biol. Chem.* 294(43) 15559–15574 15559. (2019).

KOOTER J, BORST P. 1984 Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* 12, 9457–9472.

KOURANTI, I. & PEYROCHE, A. Protein degradation in DNA damage response. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 23(5):538-45, 2012.

KRAMER, S, BANNERMAN-CHUKUALIM B, ELLIS L, BOULDEN EA, KELLY S, FIELD MC, CARRINGTON M. 2013. Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. *PLoS ONE* 8, e54004.

KRAMER S, MARNEF A, STANDART N, CARRINGTON M. 2012. Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. *J. Cell Sci.* 125, 2896–2909.

KRAMER S, PIPER S, ESTEVEZ A, CARRINGTON M. 2016. Polycistronic trypanosome mRNAs are a target for the exosome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 205, 1–5.

KRAMER S. 2017 Simultaneous detection of mRNA transcription and decay intermediates by dual colour single mRNA FISH on subcellular resolution. *Nucleic Acids Res.* 45, e49.

KRAMER, S. (2014). RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 263–284. doi: 10.1002/wrna.1207

KRAMER, S. (2017). The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. *PLoS Pathog.* 13:e1006456. doi: 10.1371/journal.ppat.1006456

KRAMER,S., MARNEF,A., STANDART,N. AND CARRINGTON,M. (2012). Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. *J. Cell Sci.*, 125, 2896–2909.

KRCHNĀ'KOVA' Z, KRAJCĀOVICĀ J, VESTEG M. 2017. On the possibility of an early evolutionary origin for the spliced leader trans-splicing. *J. Mol. Evol.* 85, 37–45.

LAGERWERFA, SASKIA.; MISCHA G. VROUWEA, RENÉ M. OVERMEERA, MARIA I. FOUSTERIA,B, LEON H.F. MULLENDERSA. DNA damage response and transcription. *DNA Repair*, 10.743– 750, 2011.

LANS, H. et al., The DNA damage response to transcription stress. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology Reviews*, volume 20 | DECEMBER 2019 | 767.

LECORDIER, L., DEVAUX, S., UZUREAU, P., DIERICK, J.F., WALGRAFFE, D., POELVOORDE, P., et al. Characterization of a TFIIF homologue from *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 64: 1164–1181. 2007.

LEE, J.H., JUNG, H.S., GUNZL, A. Transcriptionally active TFIIF of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclinactivating kinase complex. *Nucleic Acids Res* 37: 3811–3820. 2009.

LEE, KENG-BOON, et al. Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *PNAS* April 2, 2002 vol. 99 no. 7 4239–4244

LEE, S.K., YU, S.L., PRAKASH, L., PRAKASH, S. Yeast RAD26, a homolog of the human CSB gene, functions independently of nucleotide excision repair and base excision repair in promoting transcription through damaged bases. *Mol Cell Biol* 22: 4383–4389. 2002.

LEE, Y., AND RIO, D. C. (2015). Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 291–293. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316

LEGERSKI R, & PETERSON C. Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature*, Sep 3;359(6390):70-3. Erratum in: *Nature*. 1992 Dec 10;360(6404):610. 1992.

LEHMANN, A.R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 15: 15–23. 2001.

LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; GAUNT, M.W.; YEO, M.; CARRASCO, H.J.; MILES, M.A. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int. J. Parasitol.* 2009, 39, 1305–1317. [CrossRef]

LIANG, X. H., ULIEL, S., HURY, A., BARTH, S., DONIGER, T., UNGER, R., AND MICHAELI, S. (2005) A genome-wide analysis of C/D and H/ACA-like small

nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* reveals a trypanosome-specific pattern of rRNA modification. *RNA* 11, 619–645.

LIEBELT, FRAUKE., et al., Transcription-coupled nucleotide excision repair is coordinated by ubiquitin and SUMO in response to ultraviolet irradiation. *Nucleic Acids Research*, 2020, Vol. 48, No. 1 231–248

LINDELL, THOMAS. J et al., Specific Inhibition of Nuclear RNA Polymerase II by α -Amanitin. 3 June 1970; revised 27 July 1970. *SCIENCE*, VOL. 170

LOYA T, REINESA D. 2016. Recent advances in understanding transcription termination by RNA polymerase II. *F1000Res.* 5, 1478.

LU, H.Y., BUCK, G.A., Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 109–114. 1991.

MACHADO, C, R.; JOÃO P. VIEIRA-DA-ROCHA, ISABELA CECILIA MENDES, MATHEUS A. RAJÃO, LUCIO MARCELLO, MAINÁ BITAR, MARCELA G. DRUMMOND, PRISCILA GRYNBERG, DENISE A. A. OLIVEIRA, CATARINA MARQUES, BEN VAN HOUTEN AND RICHARD MC CULLOCH. Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription. *Molecular Microbiology*, 92 (4), 756–776, 2014.

MACHADO, C. A. & AYALA, F. J. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7396-401.

MAIR G, ULLU E, TSCHUDI C. 2000. Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. *J. Biol. Chem.* 275, 28 994–28 999.

MALIK, L.H.; SINGH, G.D.; AMSTERDAM, E.A. (2015). Chagas Heart Disease: Na Update. *The American Journal of Medicine*, v.128, n.11, p.1-3, novembro de 2015.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A.C.V.; VELUDO, H.H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V.L.B.; TEIXEIRA,

M.M.G. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome band Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, v.136, n.6, p. 641–655, maio de 2009.

MARCHETTI MA, TSCHUDI C, SILVA E, ULLU E. 1998. Physical and transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* genome reveals a typical eukaryotic arrangement with close interspersion of RNA polymerase II- and III-transcribed genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 3591–3598.

MARECHAL, A. & ZOU, LEE. RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Research* (2015) 25:9-23. 2015

MARIN, P. A. et al. Recruitment kinetics of the homologous recombination pathway in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* after ionizing radiation treatment. *SCIEnTIFIC REPOrTS* (2018) 8:5405 DOI:10.1038/s41598-018-23731-MARNETT, L J; PLASTARAS, JP. Endogenous DNA damage and mutation. In:*Trends Genet.* 17(4), pp. 214-21. 2001.

MARTEIJN, JURGEN A; HANNES LANS; WIM VERMEULEN; JAN H. J. HOEIJMAKERS. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *MOLECULAR CELL BIOLOGY*. volume 15, 2014.

MARTÍN-ESCOLANO, JAVIER; ENCARNACIÓN MEDINA-CARMONA, AND RUBÉN MARTÍN-ESCOLANO. Chagas Disease: Current View of an Ancient and Global Chemotherapy Challenge. <https://dx.doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00353> / *ACS Infect. Dis.*2020.

MARTINEZ-CALVILLO S, NGUYEN D, STUART K, MYLER PJ. 2004 Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot. Cell* 3, 506–517.

MENDES, I. C. O papel dos genes TcCSB e TcXPC no metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.

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

MICHAELI, S., DONIGER, T., GUPTA, S. K., WURTZEL, O., ROMANO, M., VISNOVEZKY, D., SOREK, R., UNGER, R., AND ULLU, E. (2012) RNA-seq analysis of small RNPs in *Trypanosoma brucei* reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 40, 1282–1298.

MIN, J.H., AND PAVLETICH, N.P. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449: 570–575. 2007.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, 181-4. 1999.

MOUTAOUIK M. T, et al. (2014). UVC-Induced Stress Granules in Mammalian Cells. *PLoS ONE* 9 (11): e112742. doi:10.1371/journal.pone.0112742

MUGRIDGE JS, COLLER J, GROSS JD. 2018 Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5′-3′ mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 1077–1085.

MULLER L ET AL. 2018 Genome organization and DNA accessibility control antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 563, 121–125.

MUNIANDY PA1, LIU J, MAJUMDAR A, LIU ST, SEIDMAN MM. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, Feb;45(1):23-49. 2010.

NAEGELI, H., AND SUGASAWA, K. The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair (Amst)* 10: 673–683. 2011.

NAKAZAWA, Y., et al., Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Genet*, 44(5): p. 586-92. 2012.

NGUYEN, VAN TRUNG., et al., In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by a-amanitin. 1996. 2924–2929 *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No. 15.

NGUYEN, H. D; YADAV, T; SUMANPRAVA, G; SAEZ, B; GRAUBERT, T. A; ZOU, L. Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH. *Molecular Cell* 65, 832–847, March 2, 2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28257700>>. Acesso em 24 de março de 2020.

NICOLAI, S.;FILIPPI, S.; CAPUTO, M.; CIPAK, L.; GREGAN, J.; AMMERER, G.; FRONTINI, M.; WILLEMS, D.; PRANTERA, G; S. BALAJEE, LUCA PROIETTI-DE-SANTIS. Identification of Novel Proteins Co-Purifying with Cockayne Syndrome Group B (CSB) Reveals Potential Roles for CSB in RNA Metabolism and Chromatin Dynamics. *PLOS ONE* / DOI:10.1371/journal.pone.0128558 June 1, 2015.

NISHI, R., OKUDA, Y., WATANABE, E., MORI, T., IWAI, S., MASUTANI, C., *et al.* Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol* 25: 5664–5674. 2005.

NOUSPIKEL, T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 66 (6), pp. 994-1009. 2009.

OBADO,S.O., BRILLANTES,M., URYU,K., ZHANG,W., KETAREN,N.E., CHAIT,B.T., FIELD,M.C. AND ROUT,M.P. (2016). Interactome Mapping Reveals the Evolutionary History of the Nuclear Pore Complex. *PLoS Biol.*, 14, e1002365.

OBADO,S.O., FIELD,M.C. AND ROUT,M.P. (2017) Comparative interactomics provides evidence for functional specialization of the nuclear pore complex. *Nucleus*, 8, 1–13.

OKSENYCH, V., AND COIN, F. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 9: 90–96. 2009.

OLIVEIRA, K. A. Caracterização dos genes XPV e XPF de *Trypanosoma cruzi*: envolvimento com o estresse replicativo e a quiescência celular. Relatório Parcial De Atividades - Bolsista de Pós Doutorado Junior – CNPq. 2015.

PARKER, R., AND SONG, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 121–127. doi: 10.1038/nsmb724

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *Journal of nucleic acids*. vol. 1-14, 2010.

PAVANI, R. S. Caracterização da interação RPA-1-temomero em *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2014

PAVANI, R. S. et al. Replication Protein A presents canonical functions and is also involved in the differentiation capacity of *Trypanosoma cruzi*. *Plos neglected Trop. Dis.* 10, 1–22, 2016.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, v.391, n.10115, p.82-94, janeiro de 2018.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; PEREZ, A.M.; NORMAN, F.F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. (2015). Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Disease*, v.15, n.11, p.1347-1356, novembro de 2015.

PETERSON, D.S., WRIGHTSMAN, R.A., MANNING, J.E., Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature* 322, 566–568. 1986.

PLUSKOTA-KARWATKA, DONATA Modifications of nucleosides by endogenous mutagens-DNA adducts arising from cellular processes. In: *Bioorganic chemistry*. 36 (4), pp. 198-213. 2008.

PODERYCKI, M. J., ROME, L. H., HARRINGTON, L., AND KICKHOEFER, V. A. (2005) The p80 homology region of TEP1 is sufficient for its association with the telomerase and vault RNAs, and the vault particle. *Nucleic Acids Res.* 33, 893–902

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, v.26, p.275–291, 2012.

RE, A., JOSHI, T., KULBERKYTE, E., Morris, Q., and Workman, C. T. (2014). RNA–protein interactions: an overview. *Methods Mol. Biol.* 1097, 491–521. doi: 10.1007/978-1-62703-709-9_23

REINEKE LC, DOUGHERTY JD, PIERRE P, LLOYD RE (2012) Large G3BP-induced granules trigger eIF2a phosphorylation. *Mol Biol Cell* 23: 3499–3510.

REIS-CUNHA, J.L.; BARTHOLOMEU, D.C. Trypanosoma cruzi Genome Assemblies: Challenges and Milestones of Assembling a Highly Repetitive and Complex Genome. *Methods Mol. Biol.* 2019, 1955, 1–22. [CrossRef] [PubMed]

RESENDE, B. C. et al.,. The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 28 January doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005 / 2020.

REYNOLDS D, HOFMEISTER BT, CLIFFE L, ALABADY M, SIEGEL TN, SCHMITZ RJ, SABATINI R. 2016. Histone H3 variant regulates RNA polymerase II transcription termination and dual strand transcription of siRNA loci in *Trypanosoma brucei*. *Elife* 12, e1005758.

ROCHA, ANTÔNIO AUGUSTO., ET AL., Stress Induces Changes in the Phosphorylation of *Trypanosoma cruzi* RNA Polymerase II, Affecting Its Association with Chromatin and RNA Processing.. July 2014 Volume 13 Number 7 *Eukaryotic Cell* p. 855–865.

ROCK, D. A. P. et al., UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *PNAS* u September 12, 2000 u vol. 97 u no. 19 u 10503–10508. 2000

ROMAGNOLI, B. A. A, Holetz FB, Alves LR and Goldenberg S. (2020) RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:56.doi: 10.3389/fcimb.2020.00056

ROY, D; ZHANG, Z; LU, Z; HSIEH, CL; LIEBER, M, R. Competition between the RNA transcript and the nontemplate DNA strand during R-loop formation in vitro: a nick can serve as a strong R-loop initiation site. *Mol Cell Biol.* 2010;30(1):146–159. doi:10.1128/MCB.00897-09.

ROY, N., et al., DDB2, an essential mediator of premature senescence. *Mol Cell Biol*, 30(11): p. 2681-92. 2010.

RUAN JP, ARHIN GK, ULLU E, TSCHUDI C. 2004. Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9610–9618.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F.J.; PADILLA, A.; WANG, W.; ORR, D.; TARLETON, R.L. (2018). Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*, v.7, p.1-20, março de 2018.

SANTOS-PEREIRA, J, M; AGUILERA, A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet.* 2015;16(10):583–597. doi:10.1038/nrg3961.

SARKER, A.H., TSUTAKAWA, S.E., KOSTEK, S., NG, C., SHIN, D.S., PERIS, M., *et al.* Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne syndrome. *Mol Cell* 20: 187–198. 2005.

SAXOWSKY, T.T., & DOETSCH, P.W. RNA polymerase encounters with DNA damage: transcription-coupled repair or transcriptional mutagenesis? *Chem Rev* 106: 474–488. 2006.

SCHIMANSKI B, NGUYEN TN, GUNZL A. 2005 Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7303–7313

SCHMIDT, K. AND BUTLER, J.S. (2013) Nuclear RNA surveillance: role of TRAMP in controlling exosome specificity. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 4, 217–231.

SCHWEDE,A.,MANFUL,T., JHA,B.A., HELBIG,C., BERCOVICH,N., STEWART,M. AND CLAYTON,C.E. (2009) The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, 37, 5511–5528.

SCHWERTMAN, P., et al., UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat Genet.*, 44(5): p. 598-602. 2012.

SCRIMA, A., et al., Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell*, 2008. 135(7): p. 1213-23.

SERENA NICOLAI., et al. 2015. Identification of Novel Proteins Co-Purifying with Cockayne Syndrome Group B (CSB) Reveals Potential Roles for CSB in RNA Metabolism and Chromatin Dynamics. *PLOS ONE*/ DOI:10.1371/journal.pone.0128558.

SERPELONI M, VIDAL NM, GOLDENBERG S, AVILA AR, HOFFMANN FG. 2011 Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. *BMC Evol. Biol.* 11, 7.

SHETH, U., AND PARKER, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808. doi: 10.1126/science.1082320

SIEGEL, T.N., HEKSTRA, D.R., KEMP, L.E., FIGUEIREDO, L.M., LOWELL, J.E., FENYO, D., *et al.* (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 23: 1063–1076.

SIMPSON, L et al. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. In: *Am J Trop Med Hyg.* 29(5 Suppl), pp. 1053-63, 1980.

SLUPPHAUG, GEIR; BODIL KAVLI; HANS E. KROKAN. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* Volume 531, Issues 1–2, 29 October Pages 231-251, 2003

SOHEILYPOUR, M. AND MOFRAD, M.R.K. (2018) Quality control of mRNAs at the entry of the nuclear pore: Cooperation in a complex molecular system. *Nucleus*, 9, 202–211.

SOUTOURINA, J. (2018) Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 262–274

SOUZA, D. L. Caracterização da ribonucleoproteína RBP42 no parasito *Trypanosoma cruzi* sob condições de estresse. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2019.

SRINIVASA RAO, V., et al. Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*. Volume 2014, Article ID 147648, 2014.

SRIVASTAVA A, BADJATIA N, LEE JH, HAO B, GUNZL A. 2018. An RNA polymerase II-associated TFIIF-like complex is indispensable for SL RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 46, 1695–1709.

STADLER, P. F., CHEN, J. J., HACKERMÜLLER, J., HOFFMANN, S., HORN, F., KHAITOVICH, P., KRETZSCHMAR, A. K., MOSIG, A., PROHASKA, S. J., QI, X., SCHUTT, K., AND ULLMANN, K. (2009) Evolution of vault RNAs. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1975–1991

SUQUET, C; SMERDON, M J (1993). UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. In: *J Biol Chem.* 268(32), pp. 23755-7.

TEIXEIRA, D., SHETH, U., VALENCIA-SANCHEZ, M. A., BRENGUES, M., AND PARKER, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382. doi: 10.1261/rna.7258505

TIAN, X.; NIGORA S.; ISAMIDDINOVA, RAYMOND J.; PEROUTKA, SETH J.; GOLDENBERG, MICHAEL R.; MATTERN, BENJAMIN NICHOLSON AND CRAIG LEACH. Characterization of Selective Ubiquitin and Ubiquitin-Like Protease Inhibitors Using a Fluorescence-Based Multiplex Assay Format. *MARY ANN*

LIEBERT, INC.VOL. 9 NO. 2; ASSAY and Drug Development Technologies. APRIL 2011.

TIJSTERMAN, M ET AL. (1999). RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV-induced (6-4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast. In: Mol Cell Biol. 19(1), pp. 934-40

TRESINI, M. ET AL. The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling. Nature 523, 53–58 (2015).

TRESINI, M., MARTEIJN, J. A. & VERMEULEN, W. Bidirectional coupling of splicing and ATM signaling in response to transcription-blocking DNA damage. RNA Biol. 13, 272–278 (2016).

TROELSTRA, C. et al. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. Cell. 1992 Dec 11;71(6):939-53. 1992.

TYLER WEISBARTH, R., DAS, A., CASTELLANO, P., FISHER, M. A., WU, H., AND BELLOFATTO, V. (2018). The *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein RBP42 is expressed in the cytoplasm throughout the life cycle of the parasite. Parasitol. Res. 117, 1095–1104. doi: 10.1007/s00436-018-5787-9

ULLU E, TSCHUDI C. 1991. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 10 074–10 078.

UMAKI, A. C. Caracterização das topoisomerasas II e III de *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná. 2013.

VAN GOOL, A. J. et al. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. EMBO J. 1997 October 1; 16(19): 5955–5965. 1997.

VANRELL, M.C.; LOSINNO, A.D.; CUETO, J.A.; BALCAZAR, D.; FRACCAROLI, L.V.; CARRILLO, C.; ROMANO, P.S. (2017). The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.11, n.11, p.1-23, outubro de 2017.

VERMEULEN, W., RADEMAKERS, S., JASPERS, N.G., APPELDOORN, E., RAAMS, A., KLEIN, B., *et al.* A temperaturesensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nat Genet* 27: 299–303. 2001.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*, 24:1317-31, 1994.

VIDAKOVICA, A. T. Analysis of RNA polymerase II ubiquitylation and proteasomal degradation. *Et al., Methods* 159–160 (2019) 146–156.

VIEIRA-DA-ROCHAA, J.P. *et al.*, The DNA damage response is developmentally regulated in the African trypanosome. *DNA Repair* 73 (2019) 78–90.

WALMACQ, CELINE. *et al.* Mechanism of Translesion Transcription by RNA Polymerase II and Its Role in Cellular Resistance to DNA Damage. *Molecular Cell* 46, 18–29, April 13, 2012 ©2012 Elsevier Inc.

WANG, Q. E. *et al.* p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 41(3):1722-33, 2012.

WANG, W., XU, J., CHONG, J. & WANG, D. Structural basis of DNA lesion recognition for eukaryotic transcription-coupled nucleotide excision repair. *DNA Repair* 71, 43–55 (2018).

WASMUTH EV, LIMA CD. 2012 Exo- and endoribonucleolytic activities of yeast cytoplasmic and nuclear RNA exosomes are dependent on the noncatalytic core and central channel. *Mol. Cell* 48, 133–144.

WEDEL, C., FÖRSTNER, K. U., DERR, R., & SIEGEL, T. N. 2017. GT-rich promoters can drive RNA pol II transcription and deposition of H2A.Z in African trypanosomes. *EMBO Journal*, 36, 2581–2594.

WHO – World Health Organization. Disponível em: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease (american-trypanosomiasis). Acesso em: 16 de Julho de 2020.

WOLD, M, S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:61–92. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.61.

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

WURTMANN, E. J., AND WOLIN, S. L. (2010) A role for a bacterial ortholog of the Ro autoantigen in starvation-induced rRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4022–402.

YOUSEFZADEH, M, J. & WOOD, R. D. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA Repair*, 1;12(1):1-9, 2013.

ZAMUDIO J, MITTRA B, CAMPBELL D, STURM N. 2009. Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation. *Mol. Microbiol.* 72, 1100–1110.

ZHANG, X., et al., Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet*, 44(5): p. 593-7. 2012.

ZHOU, B B; BARTEK, J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. In: *Nat Rev Cancer*.4(3), pp. 216-25. 2004.

ZINGALES, B., ANDRADE, S. G., BRIONES, M. R., CAMPBELL, D. A., CHIARI, E., FERNANDES, O., *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific

nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 1051-4. 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGESSILVA, E.; MACHADO, C.R.; (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v.12, n.2,p.240-253, março de 2012.

ZINGALES, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, v.184, p.38-52, agosto de 2018

ZOLTNER M, KRIENITZ N, FIELD MC, KRAMER S. 2018. Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 12, e0006679.

ZOU L, ELLEDGE SJ. Sensing and signaling DNA damage: roles of Rad17 and Rad9 complexes in the cellular response to DNA damage. *Harvey Lect* 2001; 97:1–15. PMID: 14562514. 2001.

Title:

Inhibition of active transcription is important for signalized death in *Trypanosoma cruzi*.

Author (s):

Isabela Cecilia Mendes¹, Willian dos Reis Bertoldo¹, Antônio Vinícius de Assis¹, Bruno Marçal Repolês¹, Wesley Roger Rodrigues Ferreira¹, Adalberto Sales Miranda Junior¹, Daniela Ferreira Chame¹, Daniela De Laet Souza¹, Raphael Souza Pavani², Andrea Mara Macedo¹, Erich Birelli Tahara¹, Glória Regina Franco¹, Stenio Perdigão Fragoso³, Maria Carolina Quartim Barbosa Elias², Carlos Renato Machado¹.

Affiliation of the author (s):

1. Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil.
2. Laboratório Especial de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo, SP. Brazil.
3. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas, Curitiba, PR, Brazil.

Corresponding authors:

Dr. Carlos Renato Machado. E-mail: crmachad1967@gmail.com

Summary:

Transcriptional stress leading to RNA polymerase stalling can be caused by DNA damage. Stalled RNA polymerase is important to signal to initiate transcription-coupled repair (TC-NER). Our group showed that high doses of UV kill the cells very fast and demonstrate that *Trypanosoma cruzi* is sensitive to UV radiation and that the DNA lesions generated in the nuclear genome of the parasite can persist. To verify if transcription blockage after UV damages is the main reason of this fast cell death in *T. cruzi*, we pre-treated parasite cells with a selective RNA polymerase II inhibitor (α-amanitin) and observed that those pre-treated cells become resistant to cell death caused by UV radiation. However, when this drug was removed and transcription process restarted, cells regain sensitivity to UV radiation once again. Similar, the gamma pre-irradiated cells are more resistant to UV when the transcription processes are absent (48 hours after gamma irradiation). This data suggests that the death observed after UV exposure is dependent on the stallment of the RNA polymerase and, therefore, dependant of an active transcription process. To confirm the importance of the stalled RNA polymerase in this process, we studied the influence of CSB, a key TC-NER protein that recognizes stalled RNA polymerases. The overexpression of TcCSB increase cells sensitivity to UV in an ATM/ATR dependent way. On the other hand, the single-knockout CSB cells shows resistance to the same treatment. Our results demonstrate that TcCSB is importante for the parasite to deal with DNA damage generated by UV radiation We also could verify that the fast death is signalized by the exposition of phosphatidilserine to the outer layer of the membrane, indicating a cell death mainly by an apoptotic-like pathway and this death can be reversed with the use of kinase inhibitors. Death signalling may be related to the presence of R-loops at the beginning of transcription, since the overexpression of proteins that reduce the formation of R-loops, such as RPA and RnaseH1 and H2, also reduce death after exposure to UV light. The work suggests that transcription blockage is stimulus to trigger apoptosis-like in *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Transcription-coupled repair, CSB, DNA damage response, cellular death.

INTRODUCTION

Nucleotide excision repair (NER) is a DNA repair pathway able to remove several kinds of DNA damages that are able to cause distortions on the DNA double strand [1]. Transcription coupled repair (TC-NER) is one of the subpathways of NER that, by its very concept, is able to

recognize damages that occurs on the location of actively transcribed genes, guarantying priority on the repair of this regions in comparison with the rest of the genome [1–4].

Although several steps from both NER subpathways are very similar, the major difference between them relies on the damage recognition on the DNA strand. The main signal for TC-NER to be initiated is the stop of the RNA polymerase in front of a distortive damage on the DNA strand [1]. After that, in mammalian cells, CSA and CSB proteins are recruited to site of the damage and CSB protein is then able to remove or displace the stalled RNA polymerase allowing the access to the repair machinery [1,5]. During this process the single strand tract and the modifications on the proteins are able to signalize the damage in an ATM/ATR dependent manner[1–3,5].

CSB is, then, a key protein in TC-NER. In humans CSB gene, also know as ERCC6 gene, codifies a protein with 168 kDa and 1493 amino acids that belongs to the SWI2/SNF2-ATPase family. This gene possesses an acidic region, rich in glycine, two predicted nuclear targeting domains and a DNA binding domain. CSB has already been implicated in several functions such as chromatin organization and RNA polymerase elongation factor [6–8]. The exact mechanism by which CSB acts on the backtracking or removal of the RNA polymerase are still in study. It is already known that the stalling of RNA polymerase is dependent on the kind of damage generated within the cell: damages such as 8-oxoguanine are tolerated by the RNA Polymerase, while damages generated by cisplatin and UV are not [9–12]. CSB undergoes post-translational modifications such as ubiquitination in the C-terminal region essential for its regulation via ubiquitin-proteasome. This process is carried out by the CSA complex that leads to the proteasomal degradation of the ERCC6, in a dose-dependent way of UVC [13], and that after stabilized, the interaction with UVSSA promotes the recruitment of the deubiquitinating enzyme USP7, leading to deubiquitination of CSB, thus preventing degradation by the proteasome[14].

The context of TC-NER in trypanosomatids is different in comparison with mammalian cells. Trypanosomatids lacks some key proteins involved on NER, like RPA3, XPA, CSA and DBB2 [15,16]. Also, *Trypanosoma brucei* present two proteins that are similar to XPB, named XPB and XPBz [17]. In trypanosomatids the CAK complex is associated with two proteins that are exclusive to the trypanosomatids, TSP1 and TSP2 [18]. Some canonical proteins involved on NER, such as ligase 3 (LIG3) are also absent in trypanosomatids, and one possibility is that they rely only on the protein ligase 1 (LIG1) in the final steps of NER [16]. In *T. brucei* the role of the main TC-NER genes involved on the response against UV radiation, cisplatin and cyclophosphamide -NER has already been evaluated. The authors were able to show that TC-

NER is the main pathway involved on this responses and that TbCSB is essential for the parasite after the damage with UV radiation and cisplatin [19].

Another major difference in the DNA metabolism context in trypanosomatids is related to the genome organization of the parasite. Most of the parasite genome is organized in polycistronic units. Those units, when under transcription, generates a single multigenic transcript that still go through the process of *trans-splicing* [20–22]. This unique structure, with the genes organized in directional gene clusters, leads to the corollary that the transcription is uniform and extensive throughout the entire genome [23], revealing the extreme importance that TC-NER has in this parasite.

In this work we study the effects of two different types of genotoxic agents, UV radiation and ionizing radiation, in the DNA metabolism of *T. cruzi*. We found that different types of DNA damages can lead to different types of death and activation of signaling pathways to mediate DNA damage response. We also observed that the first signalized cell death can be inhibited and could be related to the blockage of the transcription on the cell.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and strains

Epimastigotes cells of *T. cruzi* from wild type strain CL Brener were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium, supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum, 200 µg/L of streptomycin sulfate and 200 units/mL of penicillin, at 28° in the incubator. For the study of the TcRPA gene, epimastigotes cells of *T. cruzi* from wild type strain Y and the overexpressor and single-knockout strains for the RPA gene were used [24]. For mutant cells was added to the culture medium the respective antibiotic, hygromycin or neomycin, in the concentration of 200 µg.mL⁻¹.

Genotoxic treatment and survival curves

All the genotoxic treatment were performed with cells at logarithmic growth (1x10⁷ cells/mL). To test the resistance to UV light cells were treated with 125 µJ/cm², 250 µJ/cm², 500 µJ/cm² or 750µJ/cm², in PBS, or 1500 µJ/cm², in LIT medium, using the equipment GS GeneLinker UV Chamber (Bio-rad). For DDR inhibition cells were pre-treated for one hour prior UV radiation with 2mM of caffeine, 20µM of ATM inhibitor Ku55933 (SigmaAldrich) or 20µM of ATR inhibitor Ve821. Inhibition of both, ATM and ATR was performed by pre-treatment with 20 µM of each inhibitor. To test the effect of de-ubiquitination inhibition after UV irradiation, cells were pre-treated with 20 uM of PR-619 for 30 min (SigmaAldrich). To investigate whether the

sensitivity of *T. cruzi* to UV light is dependent on the cell cycle phase, the cells were synchronized with hydroxyurea (20mM) and the cell cycle determined by FACS. After pre-treatment cells were then exposed to UV radiation just as before, then cells were washed in PBS for 3 times and resuspended on LIT medium to allow normal growth. For gamma irradiation treatment 5mL of cells were exposed to a total dose of 3000Gy in a cobalt source on Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN-UFMG). After the treatments cells were counted in Neubauer chambers using the vital dye erythrosine. All experiments were performed in biological triplicate and the results are a representative of one experiment.

Inhibition of transcription

To investigate the phenotype of cell lines studied under the effect of inhibition of transcriptional activity, when exposed to UVC, epimastigote forms in exponential growth phase of wild cultures and TcCSB +/- were pre-treated with α -amanitin (A2263, Sigma-Aldrich, USA), at a concentration of 60 μ g/ml for 15 min, as described in the literature [25]. Thus, all cell cultures, at a concentration of 2×10^7 cells/mL, were incubated with 60 μ g/ml of α -amanitin and then washed twice with PBS 1X. The pellet was resuspended in LIT medium, then the cells were exposed to a total dose of 1,500 μ J/cm². Survival was determined as for other genotoxic treatments. All experiments were performed in biological triplicate and the results are a representative of one experiment.

UV and gamma irradiation exposure

Previous results showed that cells exposed to gamma irradiation (500Gy) abolished transcription process 48 hours after irradiation (CHAME, D. 2018). Epimastigote forms in exponential growth phase of WT cultures (2×10^7 /ml) were exposed to a total dose of 500 Gy and then cells were challenged with 1,500 J/cm² at times 0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120 and 144h after gamma radiation. Survival was determined as for other genotoxic treatments. All experiments were performed in biological triplicate and the results are a representative of one experiment.

Annexin V and Propidium iodide staining

Epimastigote cells, concentration 1×10^7 cells/mL were irradiated with 1500 μ J/cm² or 300Gy of gamma irradiation. After those cells were harvested by centrifugation at 3000 rpm, 10 minutes at room temperature. Cells were then washed 2 times in PBS, resuspended in 100 μ L of buffer and then 1 μ L of annexin V and 1 μ L of propidium iodide were added to the mix. Cells were incubated for 10 min away from the light and then 400 μ L of buffer were added to the mixture. Cells were analysed using BD FACScalibur™ flow cytometer.

Plasmid construction

For overexpression cassette construction primers were designed to amplify the entire ORF of CSB (TcCLB.506983.60), RNaseH1 (TcCLB.506351.40) and RNase H2A (TcCLB.510293.70) genes. Amplification was confirmed by agarose electrophoresis and the bands were purified from the agarose gel using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Fragments were then cloned into pGEM®-T Easy vector system, according to manufacturer's instructions and the product of the ligation was transformed into DH5 α competent bacteria by electroporation. Each transformation was performed by incubating the plasmid or product of ligation for 5 minutes with the culture, in ice. After that, the mixture was transferred to a 0,2cm cuvette (Bio-Rad) and electroporation was performed at 2,5 kV in the MicroPulser electroporator (Bio-Rad). After that 700 μ L of 2xYT liquid medium (16g/L Bacto-tryptone, 10g/L Yeast extract, 5g/L NaCl, pH 7,2) and incubated for 45 minutes at 37°C. After that culture were plated in solid 2xYT medium supplemented with 100mg/mL of ampicillin and incubated for 16 hours at 37°C. Positive clones were selected by colony PCR and positive clones were grown overnight in 2xYT liquid medium to further plasmid extraction using the kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). The plasmids then were digested with the respective enzymes. To allow the ligation with the overexpression vector pROCKneo [26] a multiple cloning site (MCS) was inserted on the vector, since the CBS gene possess internal cleaving sites for the enzymes used in this vector. The MCS was digested from the vector pBlueScriptSK+ (Addgene) using XbaI and XhoI restriction enzymes and this fragment was purified as explained before. Same enzymes were used on pROCKneo vector. MCS digested fragment and digested pROCKneo vector were then ligated by using T4 DNA Ligase (Fermentas), in reactions performed overnight at 4°C. After that CSB, RNaseH1 and RNaseH2A fragments digested from the previous pGEM®-T Easy vector were ligated into the modified pROCKneo vector.

Deletion cassette was made through successive cloning on pGEM®-T Easy vector. Briefly, primers were designed to amplify the regions 5' upstream and 3' downstream of CSB gene and the neomycin resistance gene. After that all fragments were cloned into pGEM®-T Easy vector and selection of positive clones were performed as before. 5' upstream fragment was then digested with the respective restriction enzymes to be released and vector carrying neomycin resistance gene was opened by the use of the same enzymes. Both DNA were then ligated by using T4DNA Ligase (Fermentas) in the same conditions as before. Product of ligation were transformed into DH5 α competent bacteria and positive clones were selected as before. After that the same digestion protocol were performed using 3' downstream fragment

previously cloned on pGEM[®]-T Easy vector and the newly obtained construction containing 5'upstream+neomycin fragment. The products of those digestion were then ligated as before, and positive clones harboring the full construct, *i.e.*, 5'upstream+neomycin+3'downstream were selected as before. Construction were verified by DNA sequencing.

***T. cruzi* transfection**

Transfection was performed by electroporation as the protocol described by DaRocha *et al*, 2004. Briefly, 5mL of a culture in exponential growth (concentration of 1×10^7 cells/mL) were centrifuged at 3000rpm for 5 minutes at room temperature. Cells were then washed in PBS and resuspended in 400 μ L of electroporation buffer (120 mM de KCl, 0,15mM CaCl₂, 10mM K₂HPO₄, 25 mM de Hepes, 2mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂, pH 7.6). 50 μ g of each vector was then added to each culture in a final volume of 50 μ L for each electroporation. Cultures were transfected in 0,2cm cuvettes (Bio-Rad) with 3 pulses of 0,3kV, 500mF, each pulse followed by a 30 second interval. After transfection cells were resuspended in 5mL of LIT medium and G418 antibiotic was added after 24 hours in a final concentration of 200 μ g/mL. As control, a mock electroporation using water was performed and cells were selected for 4 weeks or until no living parasites was seen on the mock culture.

RNA extraction, cDNA synthesis

A total of 2×10^8 cells on exponential growth were used in each extraction. Parasites were centrifuged for 10 minutes, 4°C, at 3000g; cells were then lysed by adding 1mL of Trizol[®] reagent, incubated for 5 minutes at room temperature and then 200 μ L of chloroform were added followed by 5 minutes incubation at room temperature. Samples were then centrifuged at 12.000g, for 15 minutes at 4°C. Aqueous phase was separated, 500 μ L of isopropyl alcohol were added, and each sample were incubated for 10 minutes at room temperature. RNA then was precipitated at 12.000g, for 15 minutes at 4°C and RNA were washed two times with 1mL of 75% ethanol, centrifuged as before and resuspended on 60 μ L of DEPC (diethyl pyrocarbonate) water, previously prepared.

After that each sample were treated with *DNA-free DNA removal kit* (Ambion) to eliminate any contaminant genomic DNA, using the protocol indicate by the manufacturer and purified by using *RNeasy MiniEluteTM Cleanup* (Qiagen). Integrity of the RNA were analysed by denaturing agarose electrophoresis and cDNA were synthesized from the total RNA using the kit *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), according to manufacturer instructions.

Real-time qPCR

Relative expression were determined relative to WT CL Brener strain used to generate the mutants. Primers used on the real time quantification are listed on Table 1 and GAPDH gene was used as endogenous control. Reactions were were conducted using the *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Each reaction consists of 2 ng of cDNA, 300 nM of primers, 5 μ L of SYBR Green Master Mix 2X, and DNase/RNase free water to 10 μ L of reaction using a 384-well plate. All experiments were performed in biological triplicate. The relative amount of TcCSB transcripts was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and all reactions were performed using Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Reaction conditions are already described in a previous study [27].

Table 1 - Primers used in this work

Primer	Sequence	Use
QPCRNuc2F	GCA CAC GGC TGC GAG TGA CCA TTC AAC TTT	DNA damage quantification
QPCRNuc2R	CCT CGC ACA TTT CTA CCT TCA ATG CCT GC	DNA damage quantification
QPCRNuc2Int	TCG AGC AAG CTG ACA CTC GAT GCA ACC AAA G	DNA damage quantification
QPCRMitF	TTT TAT TTG GGG GAG AAC GGA GCG	DNA damage quantification
QPCRMitR	TTG AAA CTG CTT TCC CCA AAC GCC	DNA damage quantification
QPCRMitInt	CGC TCT GCC CCC ATA AAA AAC CTT	DNA damage quantification
CSBfwXbaIpROCK	TCT AGA ATG GCC GAT GAT CTT TCG CAG TTG	Overexpressor cassette construction
CSBrevHindIIIpROCK	AAG CTT TCA ATC TCC ATT TTC ACC TTT TAC TTC	Overexpressor cassette construction
CSBhemi5'fw1	AGT TCA AGT GCG AGG CTC AGA	Single knockout cassette construction
CSBhemi5'fw2	AGT TCA AGT GCG AGG TTC AGG	Single knockout cassette construction
CSBhemi5'rev	GCT TTC AAT CGC TGT CGT AAA G	Single knockout cassette construction
CSBhemi3'Sallfw1	GTC GAC AGT AAT AAT TTC TTG ACG GCT GAC TG	Single knockout cassette construction
CSBhemi3'SacIrev1	GAG CTC GTA CAT ATT CGC CAT TCA CTC TGG CAA TGT	Single knockout cassette construction
CSBhemi3'Sallfw2	GTC GAC AGT AAT AAT GAC TTG ACG GCT GAC TT	Single knockout cassette construction
CSBhemi3'SacIrev2	GAG CTC TAT CCC TCA AGC CCG	Single knockout cassette

	TGG GT	construction
NeoFwXbal	TCT AGA ATG GGA TCG GCC ATT GAA CA	Single knockout cassette construction
NeoRevSall	GTC GAC TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG G	Single knockout cassette construction
GAPDH_Fw	CGG TGG ACG GTG TGT CGG TG	Real-time qPCR
GAPDH_Rev	CCG TCA GCT TGC CCT GGG TG	Real-time qPCR
Xba1_F_RH1_ORF	AAA TCTA GAA TGA TGT CGT CAT CGT CAA G	Overexpressor cassette construction
Xho1_R_RH1_ORF	AAA CTC GAG TTA CTT GTC ATC TGC GG	Overexpressor cassette construction
Xba1_F_RH2A_ORF	AAA TCT AGA ATG GCA GAG CCA CGT T	Overexpressor cassette construction
Xho1_R_RH2A_ORF	AAA CTC GAG TTA CCC CAG AGA CGG ATG	Overexpressor cassette construction

Transcription levels measurement by fluorescence microscopy

Epimastigotes cultures of 1×10^7 cells mL⁻¹ in 50 mL of LIT medium were exposed to 500 Gy (1578 Gy/h) in a cobalt (60Co) irradiator located at Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Belo Horizonte, Brazil. Cells were counted daily in a Neubauer chamber using erythrosine vital staining and samples were collected at 24 and 48 hours for immunofluorescence assays.

For the immunofluorescence assays, parasites were fixed for 20 min in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS, washed twice in PBS and spread directly on poly-L-lysine-coated slides, air dried for 20 min, and finally washed with PBS. Samples were blocked and permeabilized for 0.5 h with 2% BSA and 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, MO, US) in PBS and then washed three times with PBS. The newly synthesized RNA staining was performed using the Click-iT™ RNA Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, US), following the manufacturer instructions. The 5-ethynyl-uridine reagent (EU) was incubated for 24 hours previous the sample collection. DNA from the nucleus and kinetoplast was stained using Hoechst 3342 diluted 1/1000 in PBS (Thermo Fisher Scientific, MA, US) for 20 min. Slides were mounted with ProLong® Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States) and the samples were observed using Apotome.2 Zeiss microscope at the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) at the UFMG.

RESULTS

UV DNA Damage repair kinetics in *T. cruzi* epimastigote cells

UV DNA damage response involves several proteins that regulates distinct metabolic pathways within the cell [28]. On the DNA, UV radiation is known to cause mainly two types of lesions: 6-4 photoproducts (6-4 PP) and cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), the first being less frequent but with more potential to cause big distortions on the DNA strand [28,29]. To investigate the response in *T. cruzi* cells against UV DNA damage we exposed epimastigote cells of the parasite to $750\mu\text{J}\text{cm}^{-2}$ of UV radiation. As observed on **Figure 1A**, *T. cruzi* cells presented a fast death after 15 minutes of UV radiation exposure. Cells were able to resume their growth in later times of the UV exposure but, in comparison with non-irradiated cells, this growth is slower (right panel on **Figure 1A**). Our next step was to verify if the damages caused by UV radiation are being repaired on the nuclear DNA of the parasite by long-range PCR. As shown on **Figure 1B**, UV radiation is able to cause DNA damage on nuclear genome and the DNA lesions remain on the nuclear genome until 24 hours after DNA damage.

To verify if the lesions observed on the qPCR are really caused by UV radiation and what kind of damage can persist after the first 24 hours we used specific antibodies against 6-4PP and CPD lesions. As shown on **Figure 1C**, both lesions are generated, and we can observe, on the quantification in the lower panel (**Figure 1D**), that both lesions are still detected after 24 hours, however, 6-4PP lesions are repaired more efficiently than CPD. Together these results demonstrates that *T. cruzi* are sensitive to UV radiation, and that the DNA lesions generated in the nuclear genome of the parasite are partially repaired, but some lesions, mainly CPD lesions persist 24 hours later. *T. cruzi* response against UV and gamma radiation is distinct

To verify if the response observed after UV radiation is dose or radiation-type dependent we exposed epimastigote cells to higher doses of both genotoxic agents. Ionizing and UV radiation causes very distinct effects on the DNA of the organisms. As told before, the main effects of UV radiation is the formation of CPD's and 6-4PP's [28] and gamma radiation is able to generates mainly double strand breaks, although minor effects such as modified bases and abasic side are already described after exposure to ionizing radiation [30–32].

As shown on **Figure 2A**, after exposure to $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ of UV radiation WT *T. cruzi* cells presented a high death rate just after the exposure and this death continues until 4h. Just after the exposure (**Figure 2B**) the survival rate of the cells are below 60% and reach values under 40% after 4 hours. This result demonstrates that the cell death caused by UV radiation is fast and occur mainly in the first 4 hours after the UV exposure.

Since *T. cruzi* has already been described as highly resistant to ionizing radiation, with no description of cell death in the first 24 hours and being able to resume its growth even after exposures to extremely higher doses, such as 500Gy [33] we exposed epimastigote cells of the parasite to very higher doses of ionizing radiation. As shown on **figure 2C**, after exposure to 3000Gy of ionizing radiation no significative cell death was observed 1 hour post exposure, or in the times 24 hours, 48 hours and 72 hours. After 120 hours, the number of parasites started to decline, in a process that was not reversible even 192 hours post irradiation. Together these results demonstrates that the fast and pronounced death observed after UV irradiation is not observed in the higher doses of gamma radiation, indicating that it is consequence of the damages caused by UV radiation.

UV and gamma radiation causes different types of cellular death

One of the effects of UV radiation is the activation of apoptotic signals within the cell [28]. Since we demonstrate that UV radiation can cause fast cellular death we hypothesized that this fast death could be due apoptosis-like, and one of the mainly markers for apoptosis is the exposition of phosphatidylserine in the outer layer of the membrane of apoptotic cells [34]. To investigate this hypothesis we performed an annexin V and propidium iodide staining analysis by flow cytometry in cells after exposure to UV radiation and gamma irradiation.

As shown on **figure 3A** on the flow cytometry analysis, 1 hour after UV exposure 17,87% of the cells presented only annexin V staining, a sign of early apoptotic cells. 6,20% of the cells presented annexin V and propidium iodide staining and 2,27% of the cells presented only propidium iodide staining. After 4 hours we can observe that the percentage of cells that stained only for annexin V increased to 23,4%. The most remarkable difference, however, is that the percentage of cells that

stained for both dyes increased to 26,7%. As observed for 1 hour, the number of cells that stained for propidium iodide only is low, around 1,58%. This result demonstrates that the fast death observed after UV treatment is signalized and involves the exposition of phosphatidilserine to the outer layer of the cell membrane in the first 4 hours.

The pattern of staining observed after ionizing radiation treatment is remarkable different in comparison with the results obtained for UV radiation. As shown on **Figure 3B**, no significative staining for any of the dyes is observed in any of the cells on first time periods. Since we can observe that the cellular death starts after 72 hours of the initial exposure to ionizing radiation (**Figure 2C**), we used this time point to verify the phosphatidilserine exposition. As shown on **figure 3B**, 72 hours post irradiation the cells presented annexin V staining around 7,26% of the total population. After 120 hours we can see no significative increase in the amount of cells stained only for annexin V, but a remarkable increase in the number of cells stained only for propidium iodide. After 168 hours, 42,6% of the cells stained only for propidium iodide. On this time point we also observed an increase in the amount of cells stained only for annexin V (11,9% of the total of cells) and for both dyes (18,5% of the total).

Together, all these results demonstrates that the type of cellular death caused by each genotoxic agent is different. After UV treatment cells presented a fast cellular death, mainly signalized by the exposition of phosphatidilserine to the outer layer of the membrane, but no staining by propidium iodide, indicating a cell death mainly by an apoptotic-like pathway. After ionizing radiation we cannot observe any significative staining on the population, but in later times the cells presented a signal that could be interpreted as a necrotic cell death, although other cellular markers should be used to determine the type of death.

Death caused by UV radiation damage is signalized

As observed before, UV radiation with high doses lead to exposure of phosphatidylserine, a marker for early and late apoptosis [35]. Also, stalled RNA polymerases, such as the generated by UV radiation, could be a signal for cellular death mediated by DNA damage response factors. During DNA damage response, two main kinases involved on this process are the proteins ATM and ATR, that can control the apoptotic response of cells after UV exposure [36,37]. To further verify if the fast

death observed after UV radiation was due a signaling pathway mediated by these two kinases, we treated two strains of *T. cruzi* cells (CL Brenner and Y) with inhibitors of the DNA damage response prior UV radiation exposure.

We used caffeine, an unspecific inhibitor of DNA damage response after UV radiation exposure [38] and two specific inhibitors for ATM (iATM) and ATR (iATR) prior to UV radiation exposure. As shown on **Figure 4A and 4B**, prior inhibition with caffeine and with ATR inhibitor KU55933 (SigmaAldrich) are able to increase survival of the CL Brenner and Y cells. Inhibition with ATM inhibitor was not able to alter the survivability of the cells tested. Those results indicate that ATR is the main kinase that is involved with UV radiation damages signaling.

Active transcription is important to death after UVC exposure in *T. cruzi*

In mammalian cells, UV damage blocks transcription and stalls RNA polymerases in front of DNA lesions. This blockade is a crucial step to properly activate cellular DNA damage response. [10,39,40]. To verify if the phenotype of death observed after UV damage are related to the stalling of RNA polymerase we used α -amanitin, a drug that is capable to interact with the RNA polymerase II and block the beginning of transcription[25]. Cells were pre-treated with the drug, and then exposed to UV radiation. The pre-treatment with alpha-amanitin showed that the WT cells become resistant to UVC radiation, right after exposure (**Figure 5A**). However, when this drug was removed cells become sensitive to UVC again, as observed in the growth curve at 1h, 2h, 4h and 6 hours after irradiation (**Figure 5B**).

To further verify if ionizing radiation could be causing problems in transcription, we measured transcription process using ClickIT Click-iT™ RNA Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) on irradiated and non-irradiated cells.

As shown on **Figure 5C**, after 24 hours of ionizing radiation exposure cells presented a higher staining, indicating that the transcription level was not affected by the genotoxic treatment. However, after 48 hours transcription level are abolished as indicated in the lower panel of the figure. Since we verified that, after exposure to ionizing radiation, cells do not alter their transcriptional levels in the in the first 24 hours, but abolish transcription at 48 hours, we checked if the cell would respond differently after exposure to UV light at these times after ionizing radiation. To do so

we exposed WT cells to 500Gy of ionizing radiation, as before and, in several time points during the recovery from this genotoxic treatment, cells were also exposed to $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ of UV radiation.

Soon after the gamma irradiation, when the transcription process continuous to work, the gamma irradiated cells present similar UVC sensitivity when compared with non-gamma irradiated cells at the time points 0h, 8h and 24h (**Figure 5D**). However, the gamma irradiated cells are more resistant to UVC when the transcription processes are absent 48 hours after gamma irradiation. This higher resistance persists until gamma irradiated cells return the normal growth after 120h (**Figure 5E**). Altogether, this data suggests that the fast death observed after UV exposure is dependent on the stallment of the RNA polymerase and, therefore, dependant of an active transcription process.

TcCSB is involved on UV DNA damage response

A crucial step in the response of UV DNA damage is the recognition of the stalled RNA polymerase on the site of the lesion. The main protein involved on this recognition and the recruitment of the DNA repair factors is the protein CSB [2,3]. To investigate the DNA damage response associated to the transcription in *T. cruzi* our next step was to study the phenotype of mutant cells to TcCSB after UV radiation exposure. We generated two mutant cells, an overexpressor of TcCSB and a single knockout of TcCSB. Confirmation of the mutant cells were obtained by DNA sequencing and Real-time qPCR quantification of TcCSB transcripts. No growth impairment in normal conditions was seen for any of the mutants (**Figure S1**).

To verify the effect of TcCSB on the UV DNA damage response we exposed mutant and WT cells to $750\mu\text{J}/\text{cm}^2$. As shown on **Figure 6A**, right after UV radiation exposure, TcCSB overexpressor cells are more sensitive in comparison with wild type cells. A slightly higher resistance was observed on the single knockout cells in the same experiment. After 24 hours we can observe that both mutants have lower survival in comparison with wild type cells. This response seems to be dose dependant (**Figure S2**). All the strains are able to resume their growth after 24 hours of exposure (**Figure 6A, right panel**), although, as observed on WT cells, this growth is not the same observed on non-irradiated cells. The observed phenotype is related to the DNA repair

of these modified cells, as cells that overexpress CSB are more efficient in DNA repair, while the cell deficient in the CSB gene is not efficient in DNA repair (**Figure 6B**). These results demonstrate that TcCSB is important for the parasite to deal with DNA damage generated by UV radiation, and an excess of CSB increases the level of rapid death seen after UV irradiation, even if it is more efficient in DNA repair.

The importance of CSB for the observed death phenotype was confirmed with the USP7 protein inhibitor (PR619) which acts by desubiquitinating the CSB protein and thus preventing its degradation by the proteasome system [41]. Pretreatment with PR619 inhibitor presents the same phenotype as cells deficient in CSB, that is, resistance right after irradiation with UV light (**Figure S3**).

We also analyzed what happens to cells modified for the CSB gene in the absence of transcription (inhibited with alpha amanitin) and irradiated with UV light. The inhibition of transcription process does not interfere in CSB single knockout cells, i.e., the cell is resistant to UV light right after irradiation (**Figure S4**). On the other hand, the phenotype observed in the overexpressed CSB cell is completely different. The inhibition of transcription abolishes the rapid death seen and, unlike what was seen with the WT cell, the removal of the inhibitor and the resumption of the transcription process does not lead to cell death. On the other hand, the CSB overexpressing cell in which transcription was inhibited prior to UV irradiation presents a delay in the resumption of growth, as without the inhibition of transcription the overexpressing CSB cell resumes growth within 24 hours, but when it has the inhibition of transcription, the resumption of growth only occurs after 48 hours (**Figure 6C**).

As the overexpressing cell shows a more pronounced death after UV irradiation and the phenotype after transcription inhibition is different from that observed in WT cells, we verified whether the observed death was also signalized. As we saw with WT cells, pretreatment with caffeine is able to prevent UV light-induced death. However, unlike what was observed with the WT cell, in the CSB overexpressor cell both the ATR and ATM inhibitor are able to partially reverse cell death after UV irradiation (**Figure 6D**). These data show us that the action of CSB is capable of activating more than one signaling pathway.

R-loops can signal cell death

Since alpha amanitin inhibits the loading of RNA polymerase II into DNA, that is, the initiation of transcription; as well as the CSB overexpressor does not die after UV irradiation after transcription inhibition, we decided to verify if death signaling could be related to RNA polymerase arrest at the beginning of transcription. It is known that blocking transcription right at the beginning is capable of generating R-loops [42,43], therefore, we verified the action of proteins involved in the formation of R-loops could interfere in the death process observed after UV radiation.

Initially, we studied the phenotypes of RPA protein overexpressing cells. The RPA protein is able to bind to single-stranded DNA and thus inhibit the formation of R-loops [44,45]. It is possible to verify that these modified cells are more resistant to UV light and do not die after irradiation and these cells are able to grow back after 24 hours (**Figure 7A**).

RPA protein is also able to activate the RNaseH1 and RNaseH2, enzymes that will degrade the R-loops [44,46]. To verify the roles of these enzymes, we generated RNaseH1 and RNase H2 overexpressing cells. These modified cells are also more resistant to UV radiation, and we did not see significant death. In addition, these cells grow similarly to non-irradiated cells (**Figure 7B and 7C**).

Finally, it was recently verified in *T. brucei* that the level of R-loop varies according to the cell cycle, and in the G2 phase almost no R-loops are detected [47]. Then we synchronized the cells with hydroxyurea and analyzed their sensitivity to UV light at different stages of the cell cycle. Right after removing the hydroxyurea, when the cell is in G1/S, we find that the cell is more sensitive to UV light when compared to the unsynchronized cell. When the cell is in S-phase we saw no difference in UV light sensitivity between the synchronized and the unsynchronized cell. Finally, cells in G2 are more resistant to UV light than unsynchronized cells, which is in line with the lower amount of R-loops in this phase of the cell cycle (**Figure 8A**).

All these data suggest that the R-loop may be a very important factor in the signaling process for death seen after UV irradiation.

DISCUSSION

The first intriguing fact observed in the UV radiation response in *T. cruzi* is that, even though the parasites are not able to efficiently remove all the lesions in the DNA (as observed in **Figures 1B and 1C and 1D**), they are able to resume their growth after 24 hours (**Figure 1A**). CPD's and 6-4PP's, the main lesions generated by UV radiation as explained before, are very distortive and able to impair RNA and DNA polymerase activities [10,28,48]. There's already been described that the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* can tolerate those lesions to avoid transcription blockage [19], possibly by a translesion transcription mechanism. If that's the case also in *T. cruzi* this could avoid the death of the cells, except in the cases in which the levels of DNA lesions are too high to be tolerated. At the same time, those cells also have to be able to replicate their DNA and continue with cell cycle, even though our results demonstrate that the lesions are still present. One explanation could be the activation of the translesion synthesis mechanism by the translesion DNA polymerases. Although the overexpression of Pol η , one of the polymerases that could be activated after UV radiation, did not grant a higher resistance to UV radiation [49], we cannot exclude the possibility that the other polymerases and the natural levels of Pol η are enough for the parasite to cope with this treatment.

Cells can activate apoptotic process after DNA damage, in ways that seems to be dependant on the type of DNA damage (and therefore the sensors that has been activated), the cell cycle stage and the DNA repair proteins involved on the cascade of response, and the levels of damage [50]. Apoptosis have been described in trypanosomatids for more than 2 decades [51] but the exact mechanisms and differences of the process in comparison with other metazoans and the biological and evolutionary significance of this process in unicellular organisms are still under investigation [52].

In our experiments we were able to observe different types of death, in a manner dependant of the kind of damage that was generated (**Figures 3A; 3B**). In *T. cruzi* proteins and mechanisms of cell death have some differences in comparison with higher eukaryotes. This parasite presents two caspase homologues that are not common on higher eukaryotes: metacaspase 3 (TcMCA3) and metacaspase 5

(TcMCA5). For other unicellular organisms, metacaspases are involved on the apoptotic response control [53–55]. Although we have observed the exposition of phosphatidylserine after UV radiation, the apoptosis-like pathway observed of the parasite is not well characterized, since there's not been described yet some key components of this process, such as the liberation of cytochrome c and the function of BCL-2 proteins that are absent in *T. cruzi* [52].

Opposite to what was observed for UV radiation, exposure to high doses of ionizing radiation do not lead *T. cruzi* to a fast cell death (**Figure 2C, 5E**). It was already previously described that 500Gy of ionizing radiation is able to cause cellular growth arrest in different strains of *T. cruzi* [27,33], to generate DSB's in the genome of the parasite that are repaired in the first 48 hours, although the growth arrest is sustained long after that [33] , and that Rad51 levels are important to the repair of this DSB's and the growth resumption after the exposure [27,33,56]. Has also been described that the inhibition of the proteasome system can extend the growth arrest in *T. cruzi*, demonstrating that maintain the correct levels of the proteins might be relevant to the IR damage response and signalling [57].

In our experiments we were also able to observe that even very high doses of ionizing radiation, such as 3000Gy are not able to cause any immediate cellular death in this parasite. Contrary to what was observed after the exposure to 500Gy of ionizing radiation, we observed that cells exposed to 3000Gy of radiation are not able to resume their growth after 120 hours (**Figures 2A; 2C**). Instead, those cells entered in a cell death that seems to be not reversible.

We also observed that the death caused by IR presents a distinct pattern of staining with Annexin V + PI. Although the use of these two markers is not enough to clarify the kind of death, staining with PI is an indicative of cellular death in an independent manner of the apoptotic process. Our results also demonstrate that the transcription is diminished by exposition to 500Gy of ionizing radiation (**Figures 5C**). This result, together with the distinct pattern of staining in comparison with UV radiation, is another indication that the fast death observed in the parasite after UV radiation exposure is the result of the stallment of the transcription process.

Although the use of Annexin V and PI are not enough to determine the type of cell death observed, the late death observed in the exposed parasites is more similar

to a necrotic-like cell death. The first thing to be considered is the difference between the two types of damage generated by the damaging agents. As told before, UV radiation induces greatly distortive damages and IR is responsible to cause mainly double-strand breaks in the DNA molecule. Contrary to our results, in mammalian cells, both agents are able to induce apoptotic responses [58–60]. In those cells, a key protein for the apoptotic effect of ionizing radiation is p53 [60]. We speculate that the difference in *T. cruzi* response to ionizing radiation could be related to the lack of an identifiable direct homologue to p53 and, therefore, other pathways can be activated.

The almost instantaneous death observed after UV radiation, which is increased in TcCSB overexpressing strain, can be a suggestion of signaled cellular death mechanism. The DNA damage response (DDR) pathway is the major ruler of the metabolism after DNA damage generated by UV radiation, being able to control several points of the cellular metabolism, such as cell cycle progression, DNA repair, among others [28,61]. Among the main proteins involved in the DDR in *T. cruzi* are the proteins ATM and ATR, two transducers proteins that are related to the cellular response after UV treatment [36,62,63]. In order to test the hypothesis that the fast death observed after UV radiation were due the high levels of damage leading to the cell death signalling activation we used caffeine, an inespecific inhibithor of DDR, and specific inhibithors for ATM and ATR separately. Our results demonstrated that this fast death observed was ATR dependant in WT cells (**Figure 4A; 6D**).

In the case of the TcCSB Δ mutants, the higher sensibility observed after 24 hours, in comparison with WT cells, can be related with the way *T. cruzi* deals with this kind of lesion (**Figure 6A; 6B**). As stated before, UV radiation is able to generate distortions in the DNA double-helix. It was already described that RNA Pol II is able to perform a translesion synthesis during transcription, inserting two adenines in front of the CPD lesions, in a manner that, in *S. cerevisiae* can be error-free [10]. The passage of the RNA polymerase in front of this lesions is dependant of the levels of CSB, a crosstalk between the TC-NER and transcription translesion [64], and we suggested that TcCSB is also controlling this kind of response in *T. cruzi*. In the absence of the protein, the RNA polymerase can pass through the lesions generated by UV radiation. It would be interesting to verify the accuracy of the mRNA produced in mutant and WT cells after treatment with UV radiation.

The presence of an excess of CSB increases the efficiency of DNA repair and we suggest that this excess of TcCSB is able to recognize the stalled RNA polymerases, that otherwise would be ignored or enter in a translesion transcription process, generating a stronger signal than in the WT cells. Then in association with a stalled RNA polymerase signaling, it is associated with DNA strand break signaling caused by the DNA repair process. Reversal of signaled death with ATR and ATM inhibitors in CSB overexpressing cells is in agreement with this hypothesis. This strong signal is then interpreted by the cells as a death signal, resulting in the lower survival observed in the survival curve in the first time point (**Figure 6D**).

This scenario is consistent with our observations, in which case TcCSB is acting in the sensing of stalled RNA polymerases and transcription translesion synthesis. This could also be a reflection of *T. cruzi* genome organization, multigenic transcription and the need of this parasite in being able to guarantee the transcription. In order to further verify that the death caused by UV radiation is consequence of transcriptions problems, we used alpha-amanitin, an inhibitor of the RNA polymerase. This molecule is able to interact with the helix in the RNA polymerase and prevent the translocation of the protein [65] and therefore, cause the stallment of the RNA polymerase. As observed in our experiments (**Figure 6C**) pre-treatment with this inhibitor is able to prevent cell death. This result indicates that the fast death observed is, indeed, related to the transcription process after DNA damage.

The removal of alpha amanitin allows the resumption of the transcription process and this leads the cells to death, probably due to RNA polymerase stalled in front of the lesions, since as we can see in the repair kinetics, the lesions caused by UV are not repaired even after 24 hours after treatment. Interestingly, cells that overexpress CSB show a different phenotype when transcription is inhibited. In this case, after transcription resumes, cells are not directed to death, but take longer to resume normal growth. We suggest that in the normal transcription process, the recognition by the stalled RNA polymerase by the CSB protein amplifies the death signal, but in the absence of the start of transcription (presence of alpha amanitin), the CSB protein is able to recognize RNA polymerase stalled that had already started the transcription process. The initiation of DNA repair, in the absence of transcription initiation, creates a signaling process that does not lead to death but a cell cycle arrest

that takes longer to be turned off.. Therefore, these data suggest that signaling is not simply related to the blocking of transcription, but the timing of this and the arrest of transcription initiation may be related to the death process.

It is reported that stopping transcription at the beginning is able to generate R-loops [42,43]. To verify whether the formation of R-loops could be associated with the signaling for death, a series of experiments were carried out. The RPA protein may be associated with the formation of R-loops either by its ability to bind to the single strand of DNA, which prevents the formation of the R-loop, or by being able to activate the RNase-H enzymes that degrade RNA-DNA hybrids [44,45]. Overexpression of the RPA protein inhibits death after exposure to UV light, which may indicate the importance of the presence of R-loops for death signaling (**Figure 7A**). To confirm the importance of R-loops, we used cells that overexpress the enzymes RNase-H1 and RNase-H2 and these modified cells are also resistant to exposure to UV light (**Figures 7B; 7C**). Finally, it was recently verified that the level of R-loops in *T. brucei* varies throughout the cell cycle and the lowest levels are verified at the end of the G2 phase (74). When we synchronized *T. cruzi* cells, we found that cells in G2 were more resistant to exposure to UV light (**Figure 8A**). All these data indicate that the formation of R-loops is important for the death signaling process.

Our results demonstrate that the type of damage can be activating different cell death pathways and a crosstalk between the DNA damage, transcription and controlled cellular death. Stallment of RNA polymerase at the beginning of the transcription, and therefore, the formation of R-loops can lead to the activation of apoptotic-like death.

REFERENCES

- [1] 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>.
- [2] G. Spivak, Transcription-coupled repair: an update, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 2583–2594. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1820-x>.
- [3] 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>.
- [4] T. Nospikel, DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility, *Cell. Mol. Life Sci.* (2009).
- [5] A. Tremeau-Bravard, T. Riedl, J.M. Egly, M.E. Dahmus, Fate of RNA Polymerase II Stalled at a Cisplatin Lesion, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 7751–7759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309853200>.
- [6] C. Troelstra, A. van Gool, J. de Wit, W. Vermeulen, D. Bootsma, J.H.J. Hoeijmakers, ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes, *Cell.* (1992). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90390-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90390-X).
- [7] R. Anindya, P.O. Mari, U. Kristensen, H. Kool, G. Giglia-Mari, L.H. Mullenders, M. Fousteri, W. Vermeulen, J.M. Egly, J.Q. Svejstrup, A Ubiquitin-Binding Domain in Cockayne Syndrome B Required for Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair, *Mol. Cell.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.017>.
- [8] 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>.
- [9] S.D. Kathe, G.P. Shen, S.S. Wallace, Single-Stranded Breaks in DNA but Not Oxidative DNA Base Damages Block Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II in HeLa Cell Nuclear Extracts, *J. Biol. Chem.* (2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M313598200>.
- [10] F. Brueckner, U. Hennecke, T. Carell, P. Cramer, CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II, *Science* (80-.). (2007). <https://doi.org/10.1126/science.1135400>.
- [11] 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>.
- [12] S. Tornaletti, Transcription arrest at DNA damage sites, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.014>.

- [13] R. Groisman, I. Kuraoka, O. Chevallier, N. Gaye, T. Magnaldo, K. Tanaka, A.F. Kisselev, A. Harel-Bellan, Y. Nakatani, CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome, *Genes Dev.* 20 (2006) 1429–1434. <https://doi.org/10.1101/gad.378206>.
- [14] S. Chitale, H. Richly, Timing of DNA lesion recognition: Ubiquitin signaling in the NER pathway, *Cell Cycle.* 16 (2017) 163–171. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1261227>.
- [15] M.-M.M.-M. Genois, E.R. Paquet, M.-C.N.M.-C.N. Laffitte, R. Maity, A. Rodrigue, M. Ouellette, J.-Y.J.-Y. Masson, DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78 (2014) 40–73. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00045-13>.
- [16] D.G. Passos-Silva, M.A. Rajão, P.H. Nascimento De Aguiar, J.P. Vieira-Da-Rocha, C.R. Machado, C. Furtado, Overview of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*, *J. Nucleic Acids.* 2010 (2010) 840768. <https://doi.org/10.4061/2010/840768>.
- [17] N. Badjatia, T.N. Nguyen, J.H. Lee, A. Günzl, *Trypanosoma brucei* harbours a divergent XPB helicase paralogue that is specialized in nucleotide excision repair and conserved among kinetoplastid organisms, *Mol. Microbiol.* 90 (2013) 1293–1308. <https://doi.org/10.1111/mmi.12435>.
- [18] J.H. Lee, H.S. Jung, A. Günzl, Transcriptionally active TFIIH of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 3811–3820. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp236>.
- [19] C.R. Machado, J.P. Vieira-da-Rocha, I.C. Mendes, M.A. Rajão, L. Marcello, M. Bitar, M.G. Drummond, P. Grynberg, D.A.A. Oliveira, C. Marques, B. Van Houten, R. McCulloch, Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: Specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription, *Mol. Microbiol.* 92 (2014) 756–776. <https://doi.org/10.1111/mmi.12589>.
- [20] S.M.R. Teixeira, Control of gene expression in Trypanosomatidae, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 1503–1516. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998001200001>.
- [21] J.G. De Gaudenzi, G. Noé, V.A. Campo, A.C. Frasch, A. Cassola, Gene expression regulation in trypanosomatids, *Essays Biochem.* (2011). <https://doi.org/10.1042/BSE0510031>.
- [22] J.-P. Daniels, K. Gull, B. Wickstead, Cell Biology of the Trypanosome Genome, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (2010) 552–569. <https://doi.org/10.1128/membr.00024-10>.
- [23] T.N. Siegel, D.R. Hekstra, L.E. Kemp, L.M. Figueiredo, J.E. Lowell, D. Fenyo, X. Wang, S. Dewell, G.A.M. Cross, Four histone variants mark the boundaries of polycistronic

- transcription units in *Trypanosoma brucei*, *Genes Dev.* (2009).
<https://doi.org/10.1101/gad.1790409>.
- [24] R.S. Pavani, M.S. da Silva, C.A.H. Fernandes, F.S. Morini, C.B. Araujo, M.R. de M. Fontes, O.A. Sant'Anna, C.R. Machado, M.I. Cano, S.P. Fragoso, M.C. Elias, Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005181>.
- [25] F.D.M. Dossin, S. Schenkman, Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*, *Eukaryot. Cell.* (2005).
<https://doi.org/10.1128/EC.4.5.960-970.2005>.
- [26] W.D. DaRocha, R.A. Silva, D.C. Bartholomeu, S.F. Pires, J.M. Freitas, A.M. Macedo, M.P. Vazquez, M.J. Levin, S.M.R. Teixeira, Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: Improving vectors and electroporation protocols, *Parasitol. Res.* 92 (2004) 113–120. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1004-5>.
- [27] C.L. Alves, B.M. Repolês, M.S. da Silva, I.C. Mendes, P.A. Marin, P.H.N. Aguiar, S. da S. Santos, G.R. Franco, A.M. Macedo, S.D.J. Pena, L. de O. Andrade, A.A. Guarneri, E.B. Tahara, M.C. Elias, C.R. Machado, The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31541-z>.
- [28] 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>.
- [29] D.A. Pearlman, S.R. Holbrook, D.H. Pirkle, S.H. Kim, Molecular models for DNA damaged by photoreaction, *Science* (80-.). (1985). <https://doi.org/10.1126/science.3975615>.
- [30] UNSCEAR, Sources and effects of ionizing radiation. Volume 1. Annex B. Exposures of the public and workers from various sources of radiation., 2010.
http://www.unscear.org/docs/reports/2008/09-86753_Report_2008_Annex_B.pdf.
- [31] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), UNSCEAR, Sources and effects of ionizing radiation, 2000.
- [32] UNSCEAR, Annex G: Biological effects at low radiation doses, UNSCEAR 2000 Rep. Sources Eff. Ioniz. Radiat. (2000).
http://www.unscear.org/docs/publications/2000/UNSCEAR_2000_Report_Vol.I.pdf.
- [33] C.G. Regis-da-Silva, J.M. Freitas, D.G. Passos-Silva, C. Furtado, L. Augusto-Pinto, M.T. Pereira, W.D. DaRocha, G.R. Franco, A.M. Macedo, J.S. Hoffmann, C. Cazaux, S.D.J. Pena, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation, *Mol. Biochem. Parasitol.* 149 (2006) 191–200.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.012>.

- [34] S.H. Lee, X.W. Meng, K.S. Flatten, D.A. Loegering, S.H. Kaufmann, Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm, *Cell Death Differ.* (2013). <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.93>.
- [35] G. Mariño, G. Kroemer, Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure, *Cell Res.* (2013). <https://doi.org/10.1038/cr.2013.115>.
- [36] 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>.
- [37] T.P. Heffernan, M. Kawasumi, A. Blasina, K. Anderes, A.H. Conney, P. Nghiem, ATR-Chk1 pathway inhibition promotes apoptosis after UV treatment in primary human keratinocytes: Potential basis for the uv protective effects of caffeine, *J. Invest. Dermatol.* (2009). <https://doi.org/10.1038/jid.2008.435>.
- [38] C. Kerzendorfer, M. O'Driscoll, UVB and caffeine: Inhibiting the DNA damage response to protect against the adverse effects of UVB, *J. Invest. Dermatol.* (2009). <https://doi.org/10.1038/jid.2009.99>.
- [39] M.E. Geijer, J.A. Marteiijn, 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>.
- [40] Y. van der Weegen, H. Golan-Berman, T.E.T. Mevissen, K. Apelt, R. González-Prieto, J. Goedhart, E.E. Heilbrun, A.C.O. Vertegaal, D. van den Heuvel, J.C. Walter, S. Adar, M.S. Luijsterburg, The cooperative action of CSB, CSA, and UVSSA target TFIIH to DNA damage-stalled RNA polymerase II, *Nat. Commun.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15903-8>.
- [41] M. Altun, H.B. Kramer, L.I. Willems, J.L. McDermott, C.A. Leach, S.J. Goldenberg, K.G.S. Kumar, R. Konietzny, R. Fischer, E. Kogan, M.M. MacKeen, J. McGouran, S. V. Khoronenkova, J.L. Parsons, G.L. Dianov, B. Nicholson, B.M. Kessler, Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes, *Chem. Biol.* 18 (2011) 1401–1412. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.018>.
- [42] J.M. Santos-Pereira, A. Aguilera, R loops: New modulators of genome dynamics and function, *Nat. Rev. Genet.* 16 (2015) 583–597. <https://doi.org/10.1038/nrg3961>.
- [43] D. Roy, Z. Zhang, Z. Lu, C.-L. Hsieh, M.R. Lieber, Competition between the RNA Transcript and the Nontemplate DNA Strand during R-Loop Formation In Vitro: a Nick Can Serve as a Strong R-Loop Initiation Site, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 146–159. <https://doi.org/10.1128/mcb.00897-09>.
- [44] H.D. Nguyen, T. Yadav, S. Giri, B. Saez, T.A. Graubert, L. Zou, Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH1, *Mol. Cell.* 65 (2017) 832-

- 847.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.029>.
- [45] B.P. Belotserkovskii, S. Tornaletti, A.D.D. Souza, P.C. Hanawalt, R-loop generation during transcription: formation, processing and cellular outcomes, (2019) 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.009>.R-loop.
- [46] E. Briggs, K. Crouch, L. Lemgruber, C. Lapsley, R. McCulloch, Ribonuclease H1-targeted R-loops in surface antigen gene expression sites can direct trypanosome immune evasion, *PLoS Genet.* 14 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007729>.
- [47] M.S. da Silva, G.R. Cayres-Silva, M.O. Vitarelli, P.A. Marin, P.M. Hiraiwa, C.B. Araújo, B.B. Scholl, A.R. Ávila, R. McCulloch, M.S. Reis, M.C. Elias, Transcription activity contributes to the firing of non-constitutive origins in African trypanosomes helping to maintain robustness in S-phase duration, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54366-w>.
- [48] C. Walmacq, A.C.M. Cheung, M.L. Kireeva, L. Lubkowska, C. Ye, D. Gotte, J.N. Strathern, T. Carell, P. Cramer, M. Kashlev, Mechanism of Translesion Transcription by RNA Polymerase II and Its Role in Cellular Resistance to DNA Damage, *Mol. Cell.* 46 (2012) 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.006>.
- [49] M.B. De Moura, B.L.F. Schamber-Reis, D.G.P. Silva, M.A. Rajão, A.M. Macedo, G.R. Franco, S.D.J. Pena, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, Cloning and characterization of DNA polymerase η from *Trypanosoma cruzi*: Roles for translesion bypass of oxidative damage, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2009) 229–235. <https://doi.org/10.1002/em.20450>.
- [50] S. Nowsheen, E.S. Yang, The intersection between DNA damage response and cell death pathways, *Exp. Oncol.* (2012).
- [51] J.-C.J.C. Ameisen, T. Idziorek, O. Billaut-Mulot, M. Loyens, J.P. Tissier, A. Potentier, A. Ouaiissi, O. Billaut-Multo, M. Loyens, J.-P. Yissier, A. Potentier, A. Ouaiissi, Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival, *Parasitol. Today.* (1996). [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80652-1](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80652-1).
- [52] R.F.S. Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill, *Cell Death Dis.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>.
- [53] 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).
- [54] 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>.
- [55] 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>.
- [56] D. Gomes Passos Silva, S. da Silva Santos, S.C. Nardelli, I.C. Mendes, A.C.G. Freire, B.M. Repolês, B.C. Resende, H.M. Costa-Silva, V.S. da Silva, K.A. de Oliveira, C.F.B. Oliveira, L.F.F. Vilela, R.A.P. Nagem, G.R. Franco, A.M. Macedo, S.D.J. Pena, E.B. Tahara, P.A. Sales Junior, D.S. Moreira, S.M.R. Teixeira, R. McCulloch, S. Virgilio, L.R.O. Tosi, S. Schenkman, L.O. Andrade, S.M.F. Murta, C.R. Machado, The in vivo and in vitro roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (2018) e0006875.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875>.
- [57] P.G. Cerqueira, D.G. Passos-Silva, J.P. Vieira-da-Rocha, I.C. Mendes, K.A. de Oliveira, C.F.B. Oliveira, L.F.F. Vilela, R.A.P. Nagem, J. Cardoso, S.C. Nardelli, M.A. Krieger, G.R. Franco, A.M. Macedo, S.D.J. Pena, S. Schenkman, D.A. Gomes, R. Guerra-Sá, C.R. Machado, Effect of ionizing radiation exposure on *Trypanosoma cruzi* ubiquitin-proteasome system, *Mol. Biochem. Parasitol.* 212 (2017) 55–67.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.01.005>.
- [58] B. Kaina, DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling, in: *Biochem. Pharmacol.*, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00510-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00510-0).
- [59] C.H. Lee, S.B. Wu, C.H. Hong, H.S. Yu, Y.H. Wei, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy, *Int. J. Mol. Sci.* (2013). <https://doi.org/10.3390/ijms14036414>.
- [60] J. Lips, B. Kaina, DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts, *Carcinogenesis.* 22 (2001) 579–585.
<https://doi.org/10.1093/carcin/22.4.579>.
- [61] D. Edifizi, H. Nolte, V. Babu, L. Castells-Roca, M.M. Mueller, S. Brodesser, M. Krüger, B. Schumacher, Multilayered Reprogramming in Response to Persistent DNA Damage in *C. elegans*, *Cell Rep.* 20 (2017) 2026–2043.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.028>.
- [62] G.G. Oakley, L.I. Loberg, J. Yao, M.A. Risinger, R.L. Yunker, M. Zernik-Kobak, K.K. Khanna, M.F. Lavin, M.P. Carty, K. Dixon, UV-induced hyperphosphorylation of replication protein a depends on DNA replication and expression of ATM protein, *Mol. Biol. Cell.* (2001). <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1199>.
- [63] J.C. Saldivar, D. Cortez, K.A. Cimprich, The essential kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 622–636.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.67>.
- [64] S.-K. Lee, S.-L. Yu, L. Prakash, S. Prakash, Requirement for Yeast RAD26, a Homolog of the Human CSB Gene, in Elongation by RNA Polymerase II, *Mol. Cell. Biol.* (2001).

<https://doi.org/10.1128/mcb.21.24.8651-8656.2001>.

- [65] P. Cramer, D.A. Bushnell, R.D. Kornberg, Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 ångstrom resolution, *Science* (80-.). (2001).
<https://doi.org/10.1126/science.1059493>.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – *T. cruzi* response against UV radiation exposure - A) Survival and growth curves of wild type cells of *T. cruzi* after exposure to $750\mu\text{J}/\text{cm}^2$ of UV radiation. Just after 15 minutes of UV radiation exposure the parasite presented a fast cell death. After 24 hours the parasite was able to resume its growth, although not at a normal rate. **B)** DNA repair kinetics of the nuclear and mitochondrial genome of cells exposed to UV radiation. Parasite is able to repair the majority of damages generated on the kDNA after 24 hours. No significant difference can be observed on the nuclear DNA repair kinetics after 24 hours. **C)** Immunofluorescence microscopy of lesions caused by UV radiation in *T. cruzi*. On the left panel a representative image of parasites just after the exposure to UV radiation and 24 hours after exposure, using antibody against 6-4PPs lesions. On the right panel a representative image of parasites on the same time periods, in the same treatment, for detection of CPD's formed after UV radiation. **D)** Quantification of percentage of cells with positive detection to each one of the lesions caused by UV radiation (6-4PPs on the left panel and CPD's on the right panel). Both lesions are still detected after 24 hours, with the majority of them being CPD's.

Figure 2 – Cell survival and growth after irradiation with $1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ of UV radiation – A) Growth of cells treated with UV radiation on times 15 minutes, 4 hours, 24 hours and 48 hours after irradiation. The higher death occurs after 4 hours after the exposure. **B)** Survival rate of cells on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells. **C)** Growth curve of cells exposed to 3000Gy of ionizing radiation. No significant death can be noticed on the deaths in the first 72 hours after exposure.

Figure 3 – Annexin V and propidium iodide assay of irradiated cells – A) On the left panel the percentage of cells that presented annexin V and propidium iodide staining in flow cytometry analysis after UV radiation exposure. 1 hour after the treatment 17,87% of cells presented only annexin V staining. On 4 hours 26,7% of cells presented staining of both dyes, annexin V and propidium iodide. On the right panel a representative result of the analysis on the flow cytometer. **B)** On the left panel the percentage of cells that presented annexin V and propidium iodide staining on the time points analysed after exposure to 3000Gy of ionizing radiation. 2 hours after irradiation there's no significant difference in comparison with non-irradiated cells. Significant staining for annexin V can be seen after 72 hours and is increased until 168 hours. Propidium iodide is absent until 72 hours, and after that increases significantly

until 168 hours. On the right panel a representative result of the analysis on the flow cytometer.

Figure 4 – DDR inhibitors alter cell survival after UV radiation – A) Survival rates of cells pre-treated caffeine and then exposed to UV radiation. Caffeine was able to restore the survival of WT strains after the genotoxic treatment and the survival rates of cells pre-treated with caffeine, ATM inhibitor and ATR inhibitor and then exposed to UV radiation. Only ATR inhibitor and caffeine were able to increase survival against UV radiation. **B)** Survival rates of cells pre-treated caffeine and then exposed to UV radiation. Caffeine was able to restore the survival of Y strains after the genotoxic treatment and the survival rates of cells pre-treated with caffeine, ATM inhibitor and ATR inhibitor and then exposed to UV radiation. Only ATR inhibitor and caffeine were able to increase survival against UV radiation.

Figure 5 - Cell survival to UV during absence of transcription: Cell survival and growth in cells pre-treated with α -amanitin and exposed to UV. **A)** Survival rate of cells (WT) on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells. Survival rates of cells (WT) pre-treated with alpha-amanitin (60ug / ml) for 15 min and then exposed to UV radiation ($1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$). **B)** Growth of cells (WT) pre-treated alpha-amanitin and then exposed to UV radiation. On times 5 minutes, 1, 2, 4, 6 and 24 hours after irradiation. **C)** Immunofluorescence images of *T. cruzi* epimastigotes after gamma radiation exposure. Samples were collected 24 and 48 hours after gamma radiation. The newly synthesized mRNA staining was performed using the click it RNA imaging kit with plus the Alexa Fluor 594-conjugated. The staining of nuclear and kinetoplast DNA was performed with Hoechst 33342. Magnification bars: 10 μM . Untreated: non-irradiated cultures. **D)** Wild-type cells pre-treated with 500 Gy (WT+GAMA) and controls (WT) were challenged with $1,500\text{ J}/\text{cm}^2$ (WT+UV and WT+GAMA+UV) at times 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h and 144h after gamma radiation in comparison with non-irradiated cells and survival determined. **E)** Growth curve of wild-type cells pre-treated with 500 Gy (WT+GAMA) and control non-irradiated cells (WT). The cells were counted in a cytometric chamber at the indicated periods 5', 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h and 192 hours. Experiment performed in triplicate.

Figure 6 – TcCSB mutants response against UV radiation exposure – A) Survival curves of TcCSB overexpressor and single knockout strains after exposure to $750\mu\text{J}/\text{cm}^2$ of UV radiation. TcCSB overexpressor strain is more sensitive to UV radiation in comparison with WT strain 15 minutes after exposure. No significative difference was observed for the single knockout cell.

Cellular growth of cells exposed to $750\mu\text{J}/\text{cm}^2$ of UV radiation. After the differential death observed for the first time point analysed, all strains are able to resume their growth, although not at a normal rate in comparison with the respective non-irradiated cells. Cell survival and growth in CSB overexpressors cells pre-treated with α -amanitin and exposed to UV. **B)** DNA repair kinetics of the nuclear genome of cells exposed to UV radiation (wild-type (WT), TcCSB overexpressor and TcCSB single-knockout). TcCSB overexpressor cells efficiently repairs most damage generated in DNA until 06 hours. **C)** Survival rates of cells (CSB⁺⁺⁺) pre-treated with alpha-amanitin (60ug / ml) for 15 min and then exposed to UV radiation ($1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$ on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells and growth of cells (CSB⁺⁺⁺) pre-treated alpha-amanitin and then exposed to UV radiation. On times 5 minutes, 1, 2, 4, 6 and 24 hours after irradiation. **D)** Survival rates of CSB overexpressor cells pre-treated with caffeine, ATM inhibitor and ATR inhibitor and then exposed to UV radiation.

Figure 7 – Cell survival and growth in mutants cells exposed to UV. **A)** Survival rates of cells (RPA⁺⁺⁺) exposed to UV radiation ($1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$) on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells and growth of cells (RPA⁺⁺⁺) exposed to UV radiation. On times 5 minutes, 24, 48, 72 hours after irradiation. **B)** Survival rates of of RNaseH1 overexpressor cells exposed to UV radiation ($1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$) on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells and growth of cells (RNaseH1) exposed to UV radiation. On times 5 minutes, 2, 4, 24 hours after irradiation. **C)** Survival rates of of RNaseH2A overexpressor cells exposed to UV radiation ($1500\mu\text{J}/\text{cm}^2$) on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells and growth of cells (RNaseH2A) exposed to UV radiation. On times 5 minutes, 2, 4, 24 hours after irradiation.

Figure 8 - Cell cycle analysis and cell survival. **A)** The Wild-type cells cells were synchronized with hydroxyurea (20 mM), and the cell cycle determined by FACS. For the labeling of the DNA content propidium iodide was used. How they were read in the FACSCan device (Benckton-Dickson) and the results achieved in the form of a histogram in FlowJo v10 programs. The results are generated in the form of histograms, which are on the graph, non-synchronized cells (control, in blue) and synchronized cells (treated, in red) at times 5', 3 hours, 6 hours and 20 hours to check whether the G1 / early of S / S and G2 phase of the cell cycle, respectively, for synchronized cells. After synchronization, cells were treated with $1500\text{ J}/\text{m}^2$ and rates given for wild-type CL Brener control epimastigote cells (WT) and treated with $1,500\text{ J}/\text{cm}^2$ (WT +

UV) and wild cell synchronized in cell cycle phase and treated with 1,500 J/cm² (WT + HU + UV) in Log¹⁰.

Supplementary figure – 1) A) Alignment of TcCSB predicted sequence and TcCSB overexpressor strain. No difference was found on the sequence of the TcCSB used to generate the mutant strain. **B)** Alignment of the cassette used for the Generation of TcCSB single knockout mutante. No difference was found on the sequence used in the generation of this mutant strain. **C)** Relative quantification by real-time qPCR of TcCSB transcripts levels in mutant strains. Ct values were compared with the WT strain.

Supplementary figure – 2) WT and CSB mutante cells were exposed to 125 **(A)**, 250**(B)** and 500**(C)** J/m² of UVC light. Survival of each mutant is dose dependant with the increase of UV light.

Supplementary figure – 3) Survival rates of WT cells pre-treated with PR-619 (20uM / ml) for 30 min and then exposed to UV radiation (1500μ\cm² on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells.

Supplementary figure – 4) Survival rate of CSB single-knockouts cells (CSB +/-), on the first times after exposure, in comparison with non-irradiated cells. Survival rates of CSB single-knockouts cells (CSB +/-) pre-treated with alpha-amanitin (60ug / ml) for 15 min and then exposed to UV radiation (1500μ\cm²). Growth of CSB single-knockouts cells (CSB +/-) pre-treated with alpha-amanitin and then exposed to UV radiation. On times 5 minutes, 1, 2, 4, 6 and 24 hours after irradiation.

FUNDING:

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

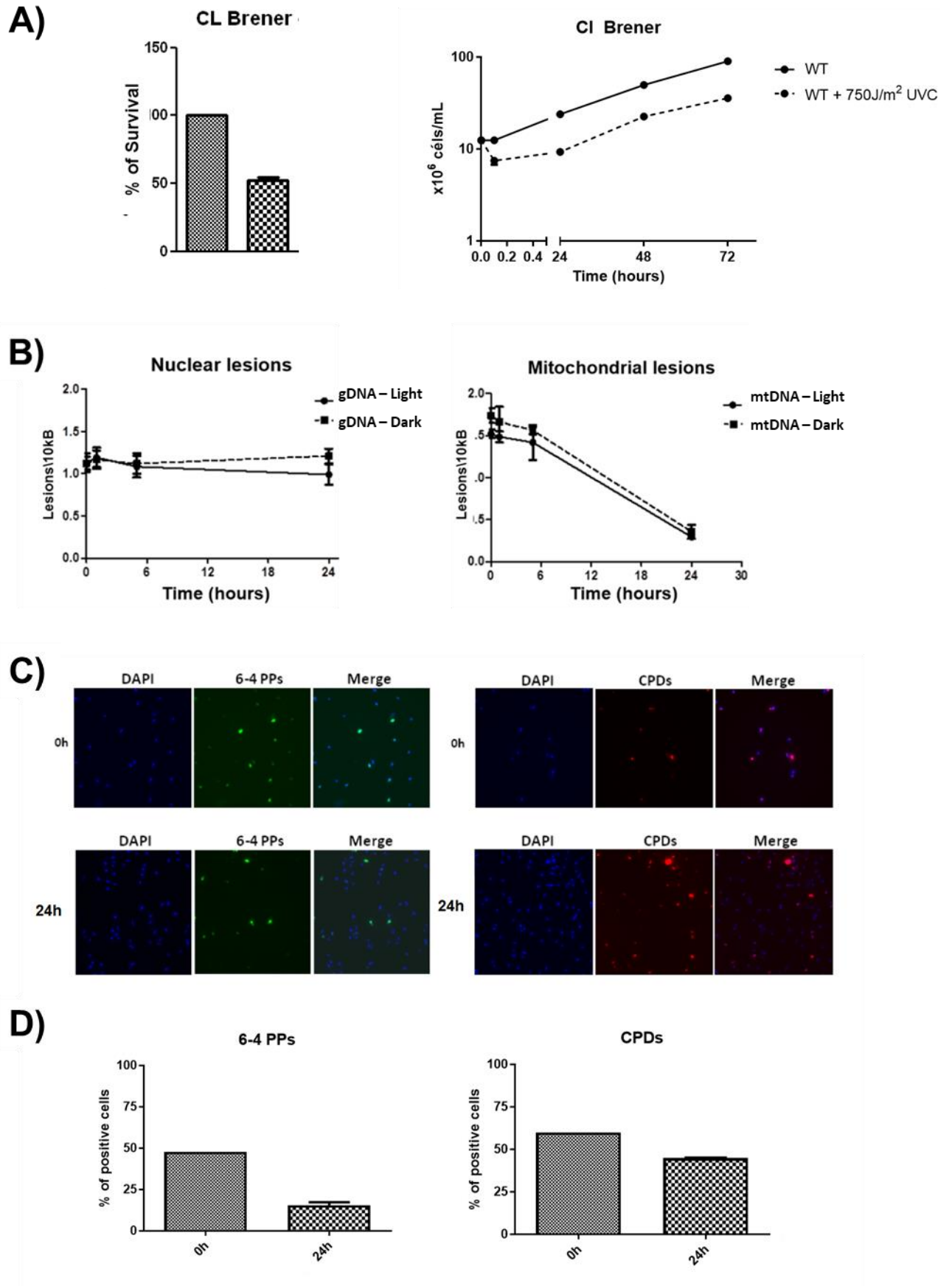
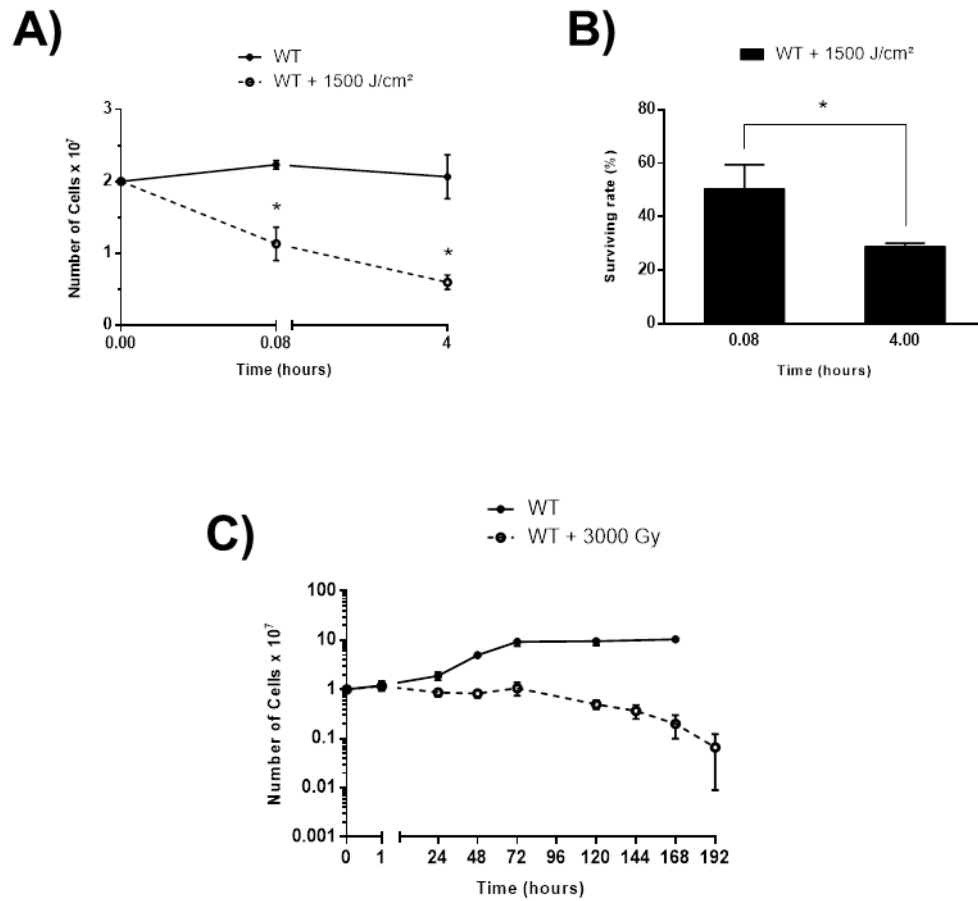
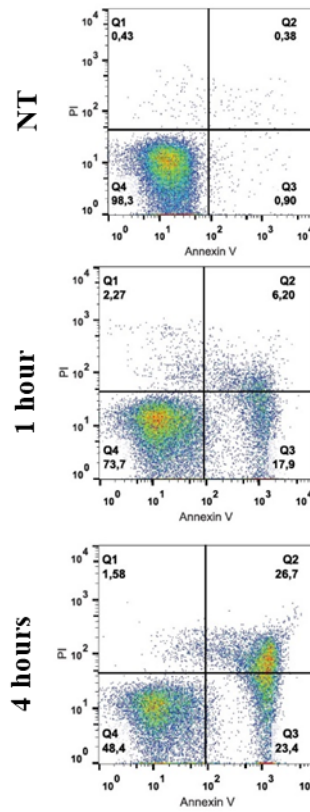
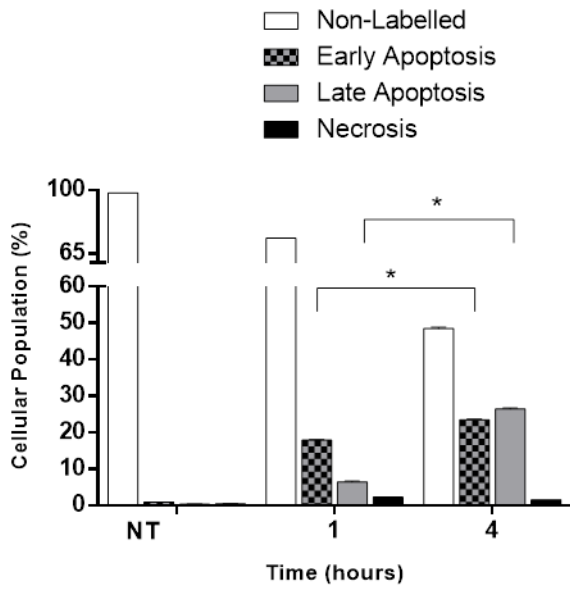


Figure 1

**Figure 2**

A)



B)

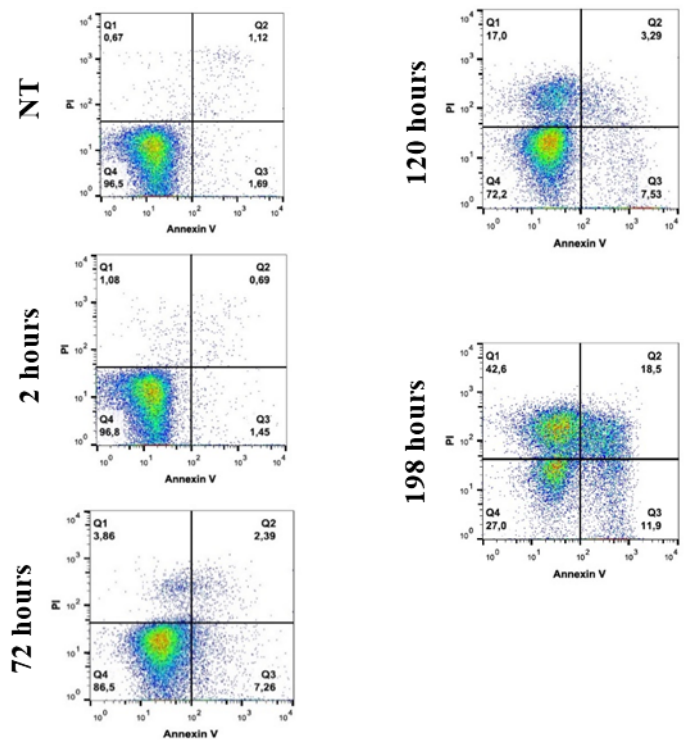
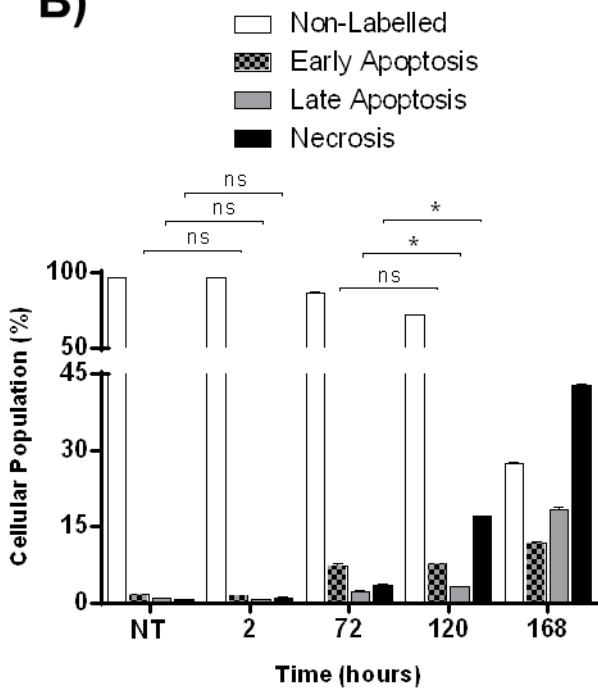


Figure 3

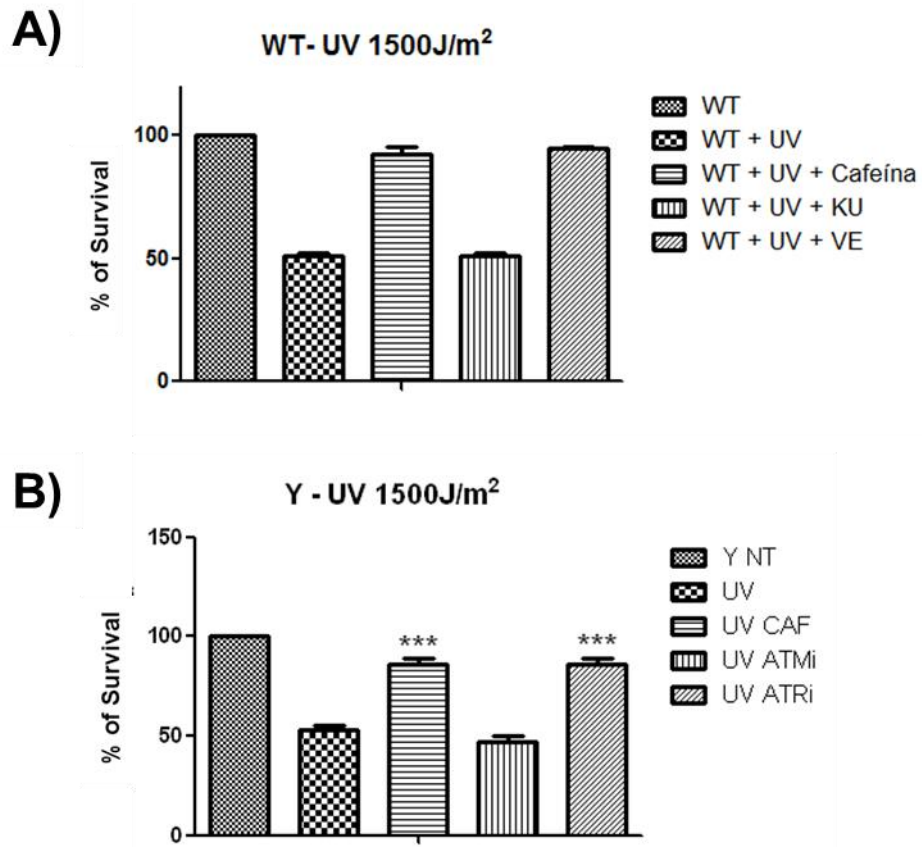
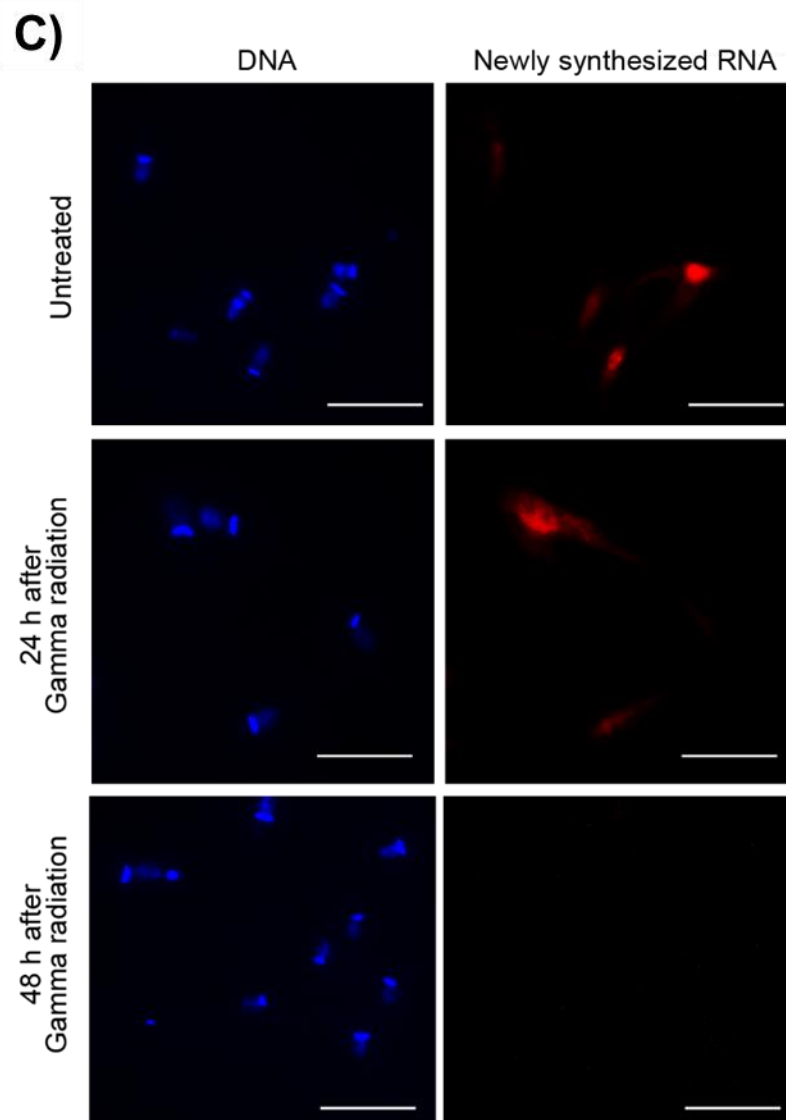
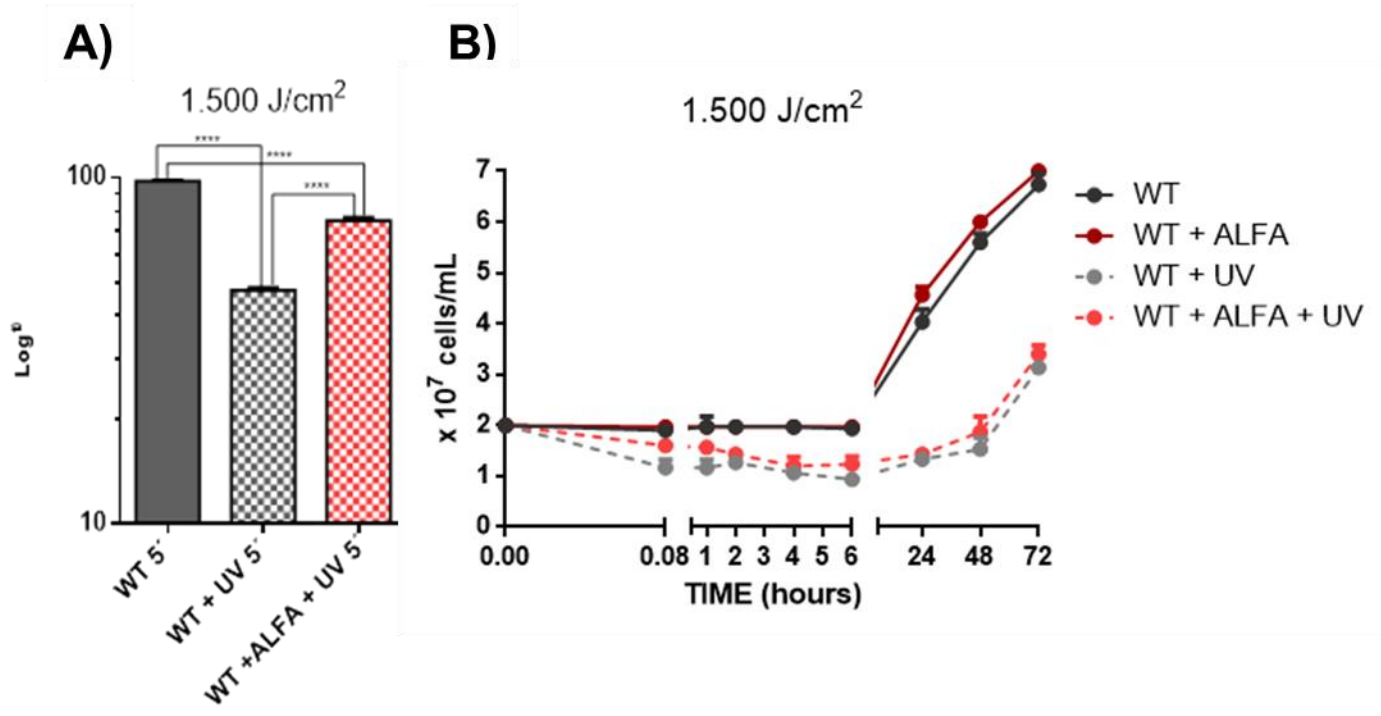
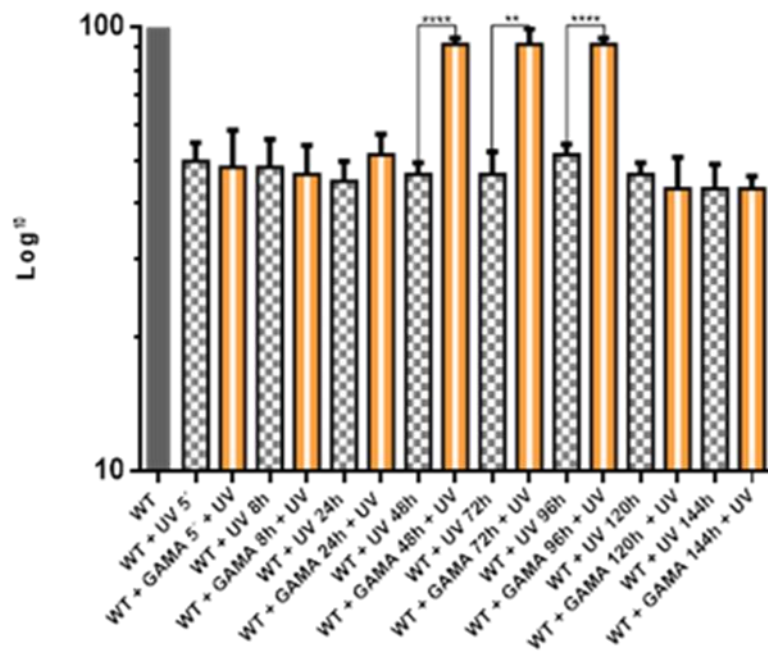


Figure 4



D)



E)

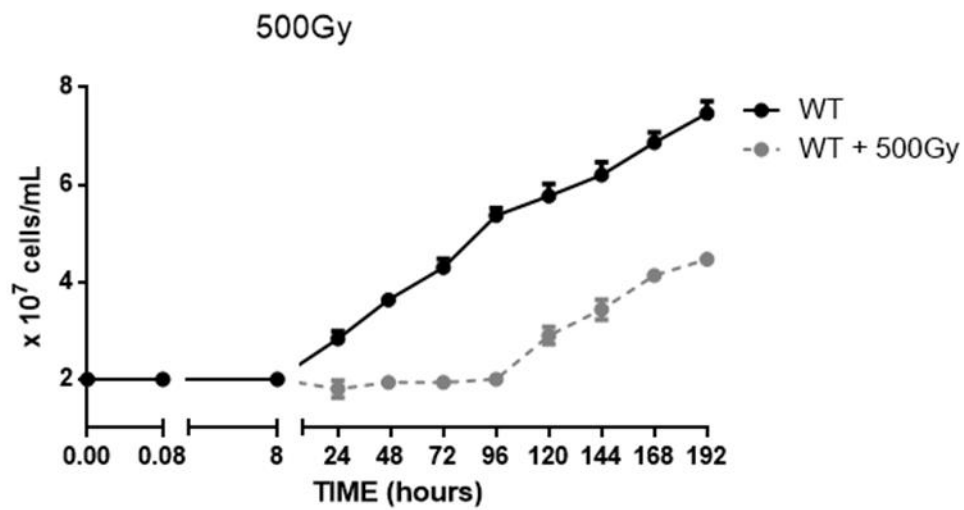


Figure 5

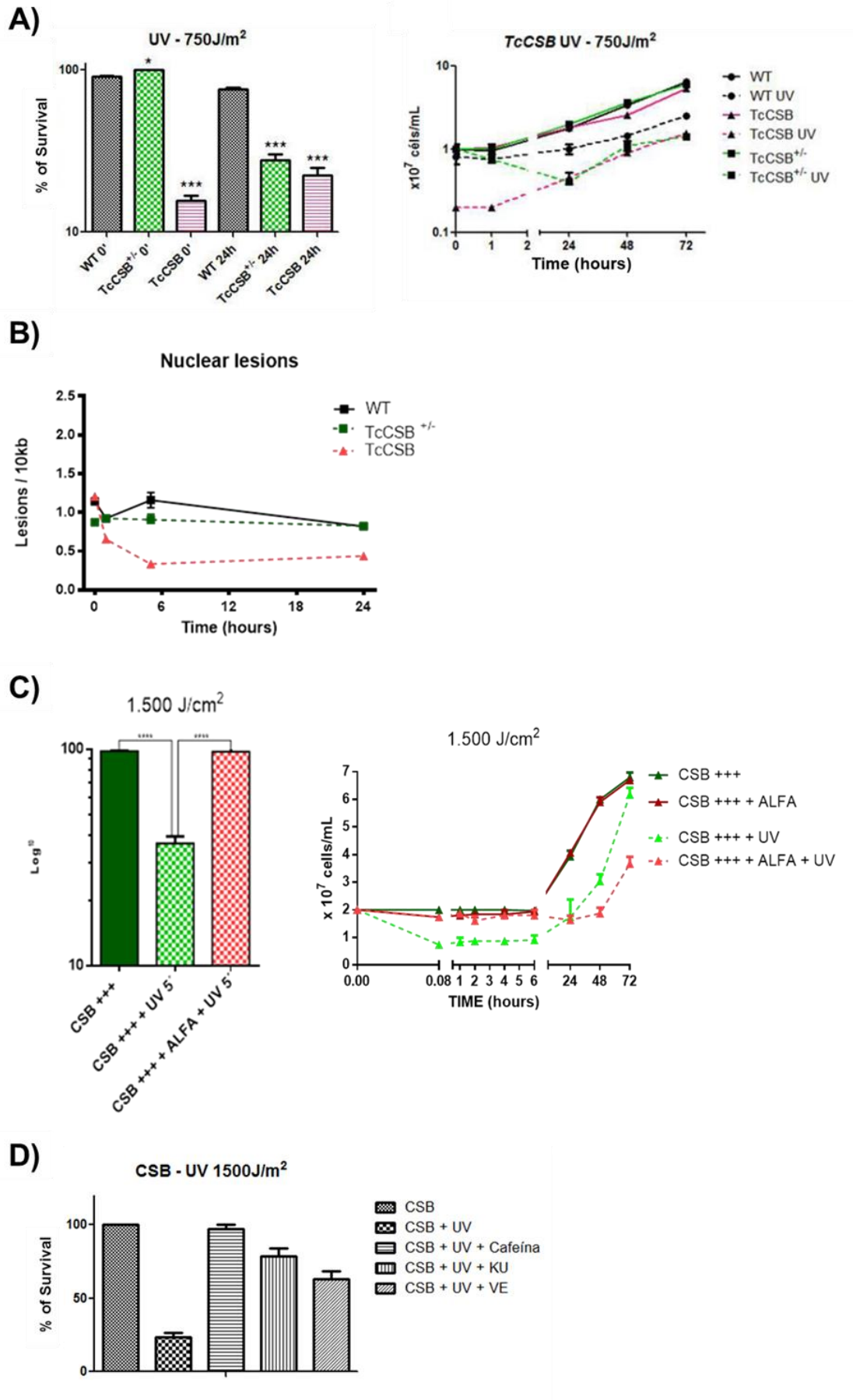


Figure 6

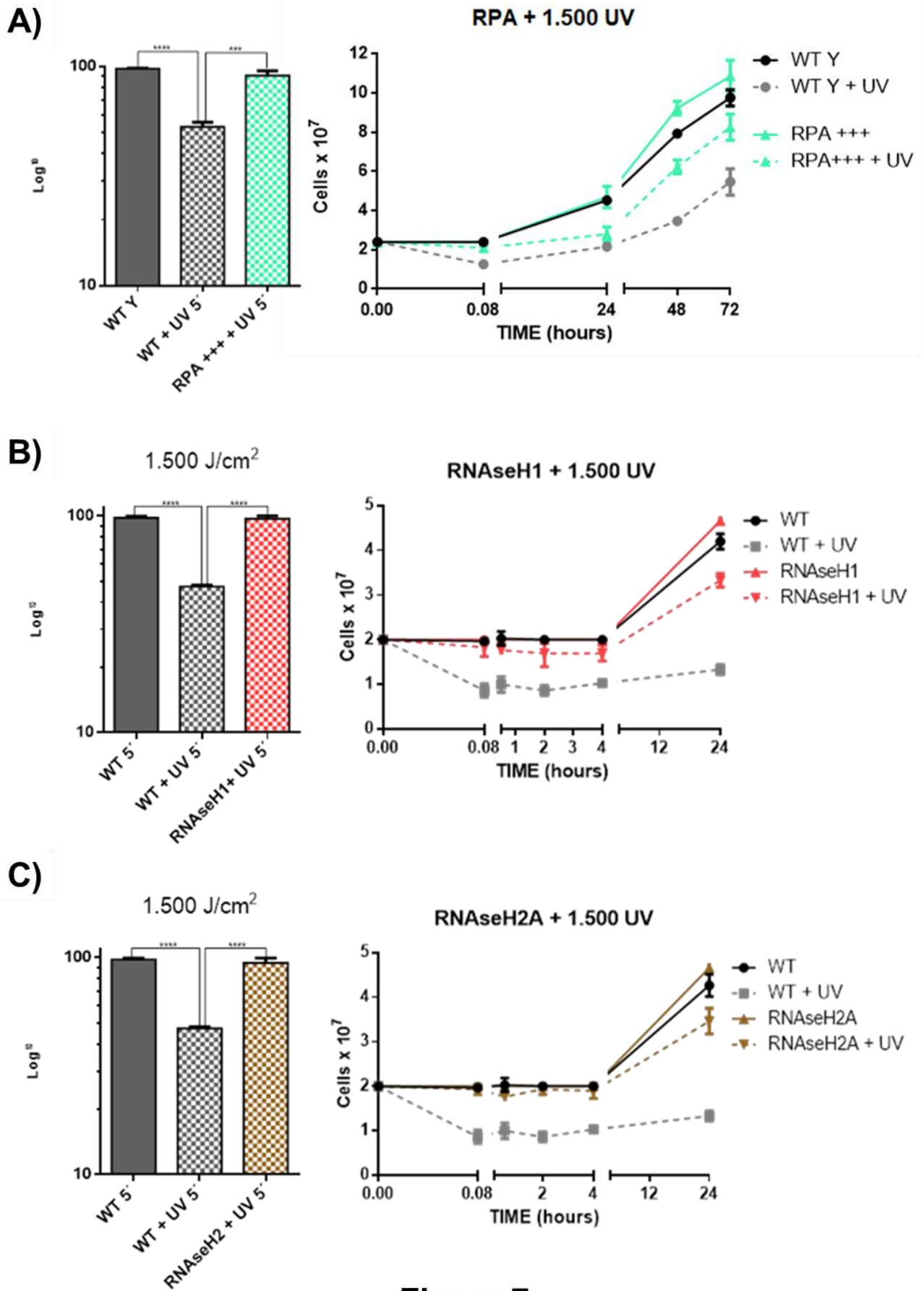


Figure 7

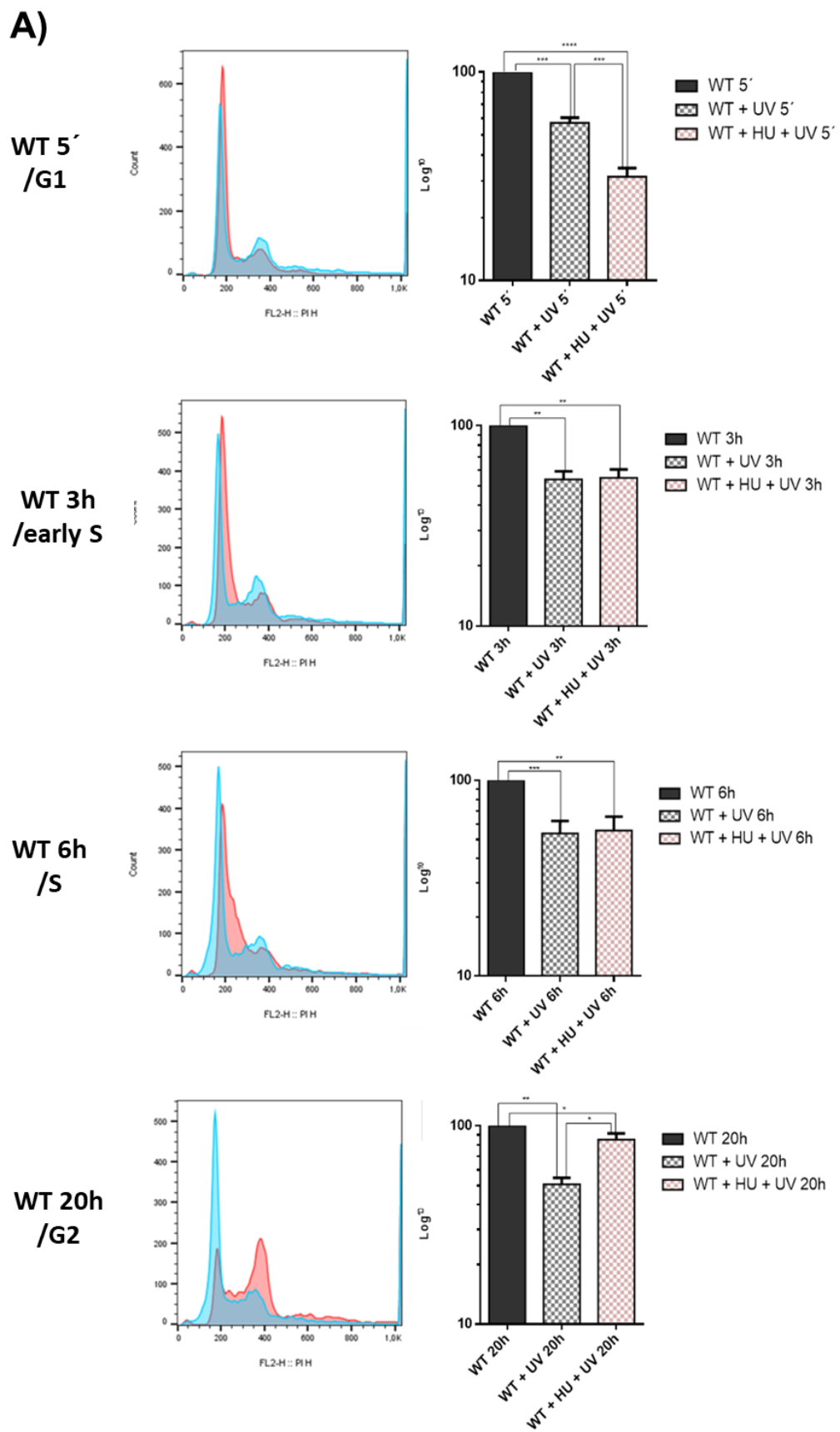


Figure 8

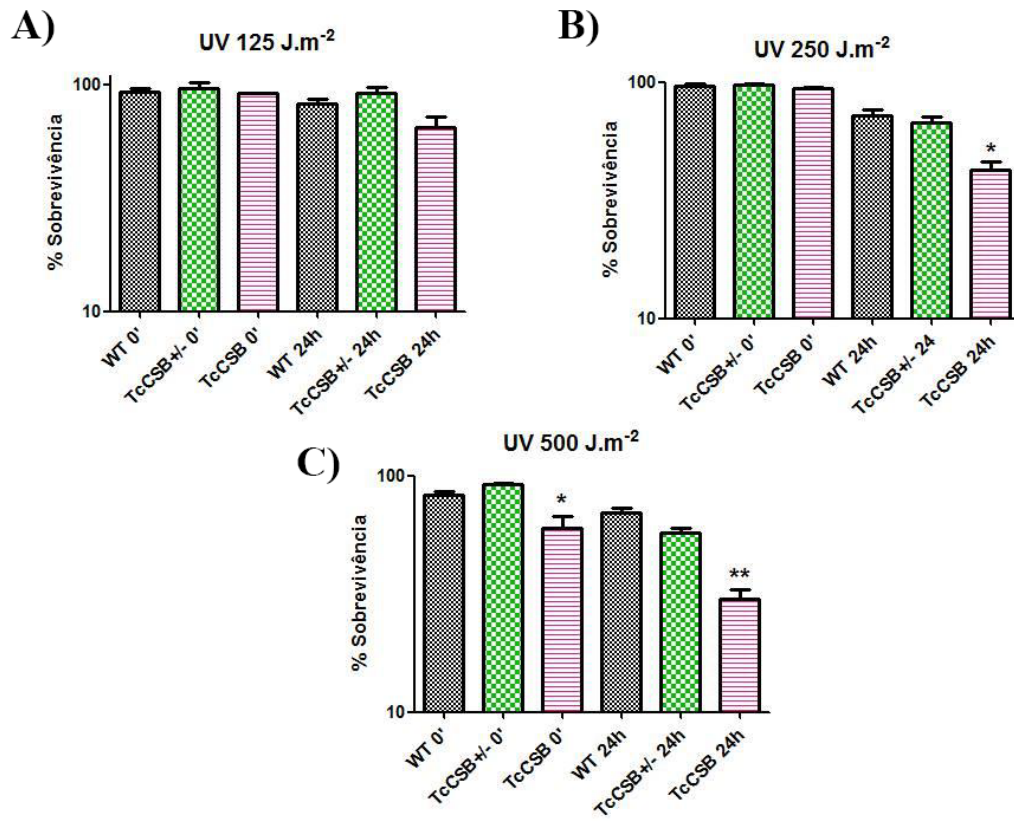
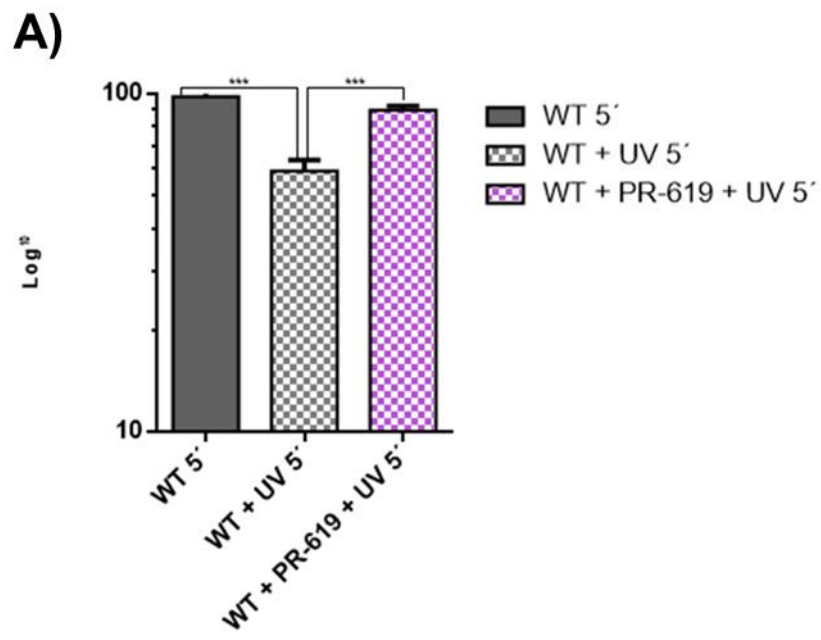
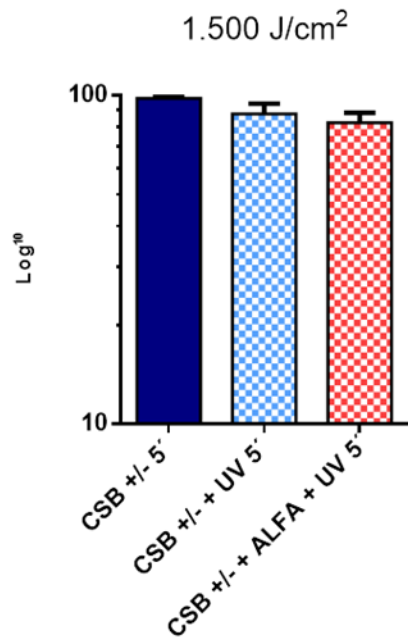
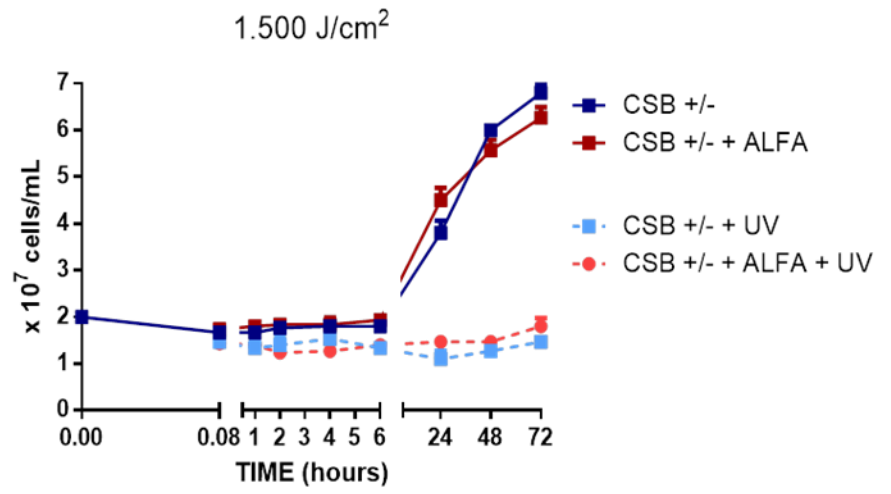


FIGURE S2

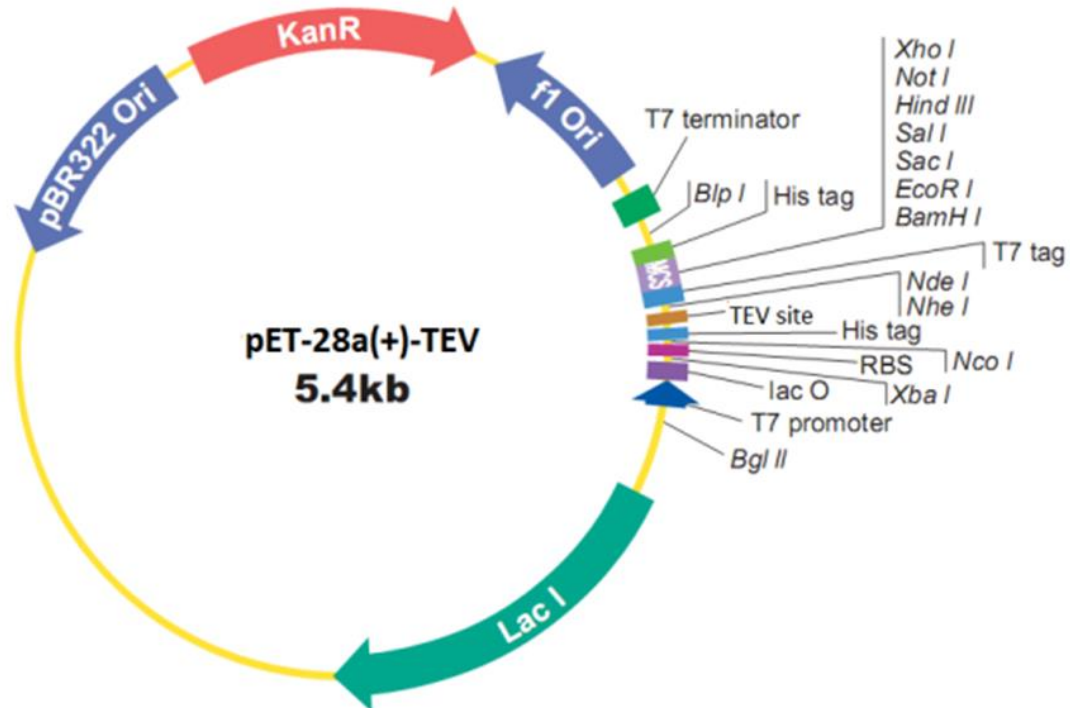


Supplementary figure 3

A)**B)****Supplementary figure 4**

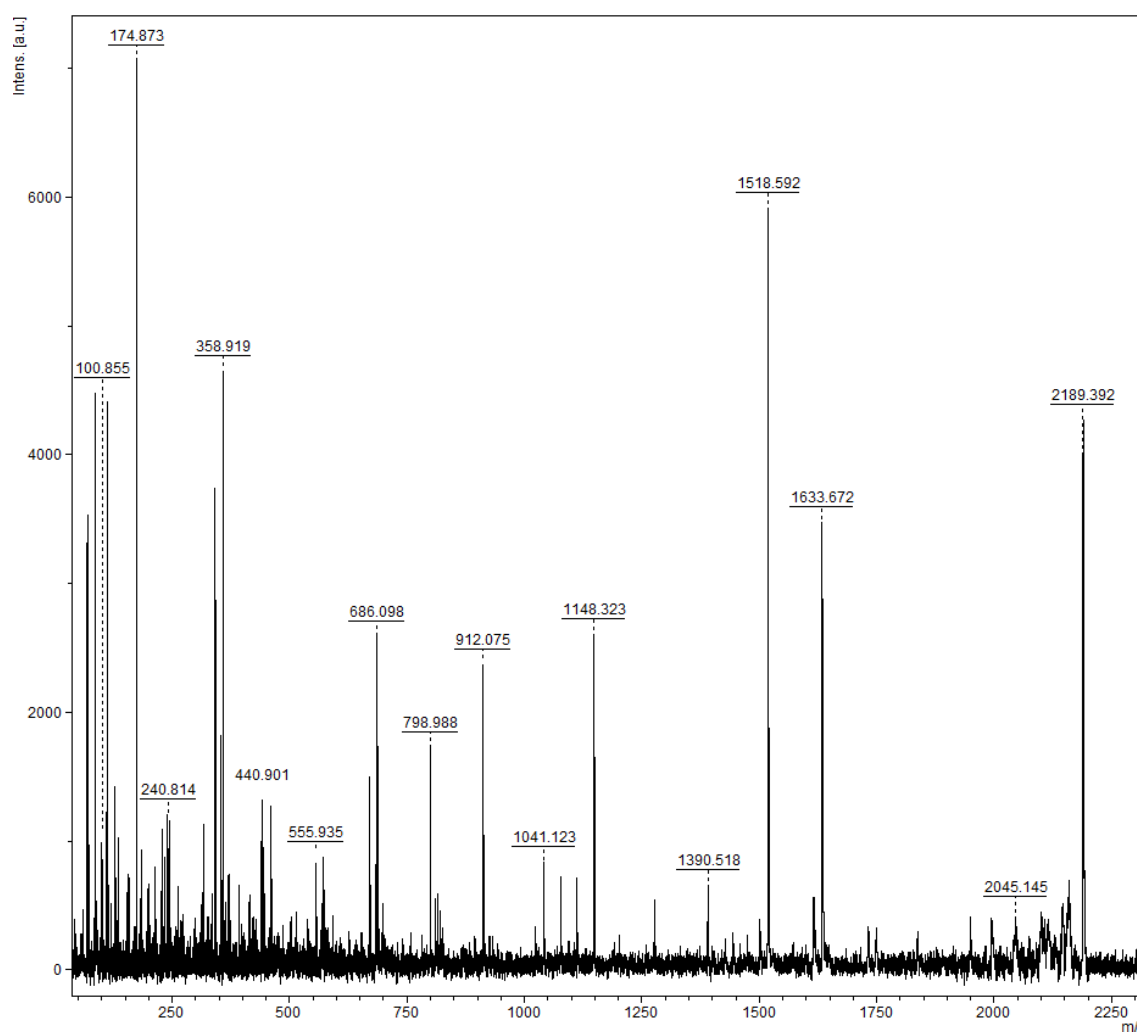
ANEXOS

1 – Mapa do vetor pET28-a + TEV.



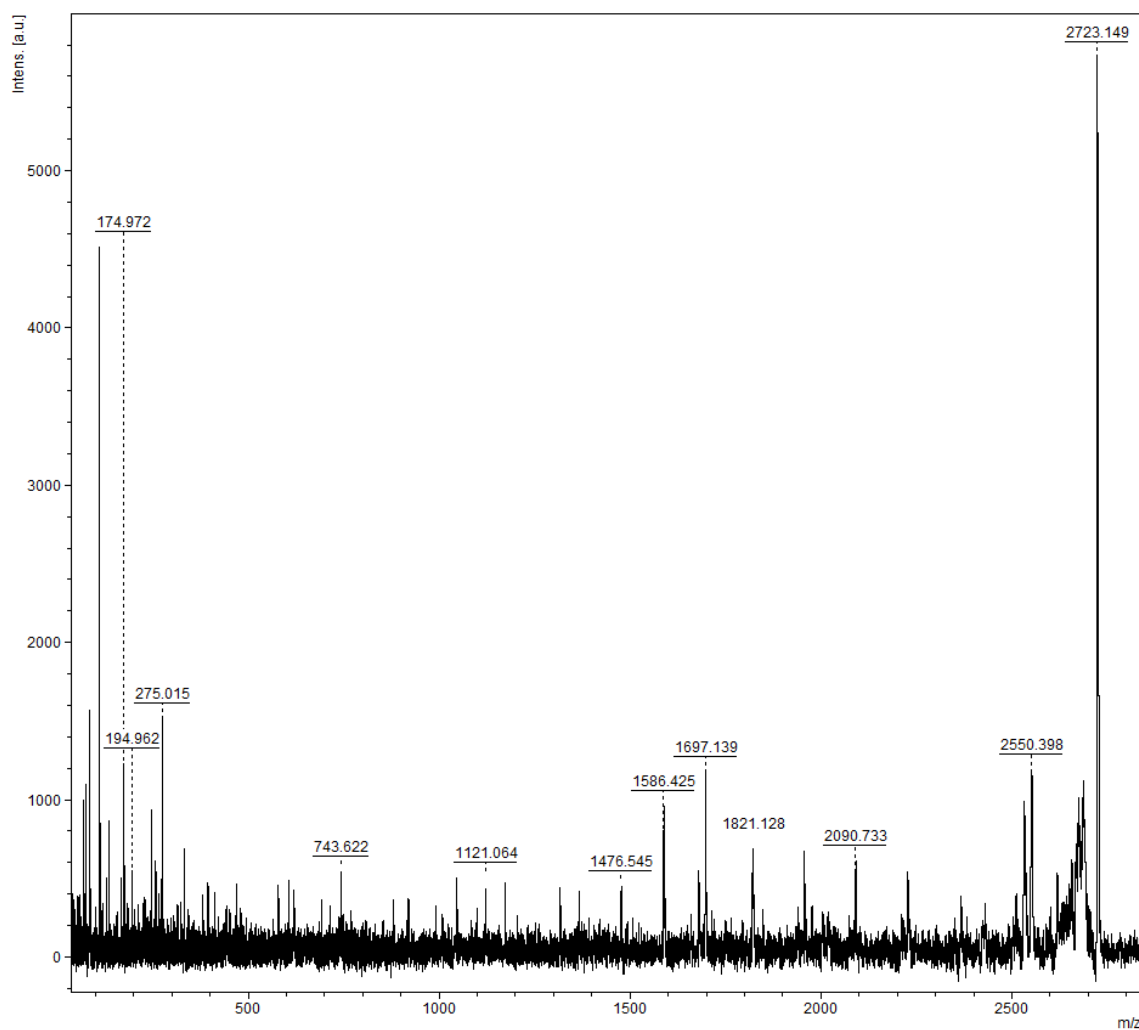
Mapa circular do vetor pET28-a+TEV. Modificado para conter um sítio de clivagem da cauda de histidina pela protease TEV. Composto pelas regiões T7 promotor T7 e terminador e gene de resistência bacteriana, canamicina (KanR). Utilizado para a expressão heteróloga da sequência de nucleotídeos codificando para o domínio catalítico de TcCSB clonado em sítio de [NheI] e [EcoRI].

2 – Espectro de massa da amostra número 1 para TcCSB por MS/MS.



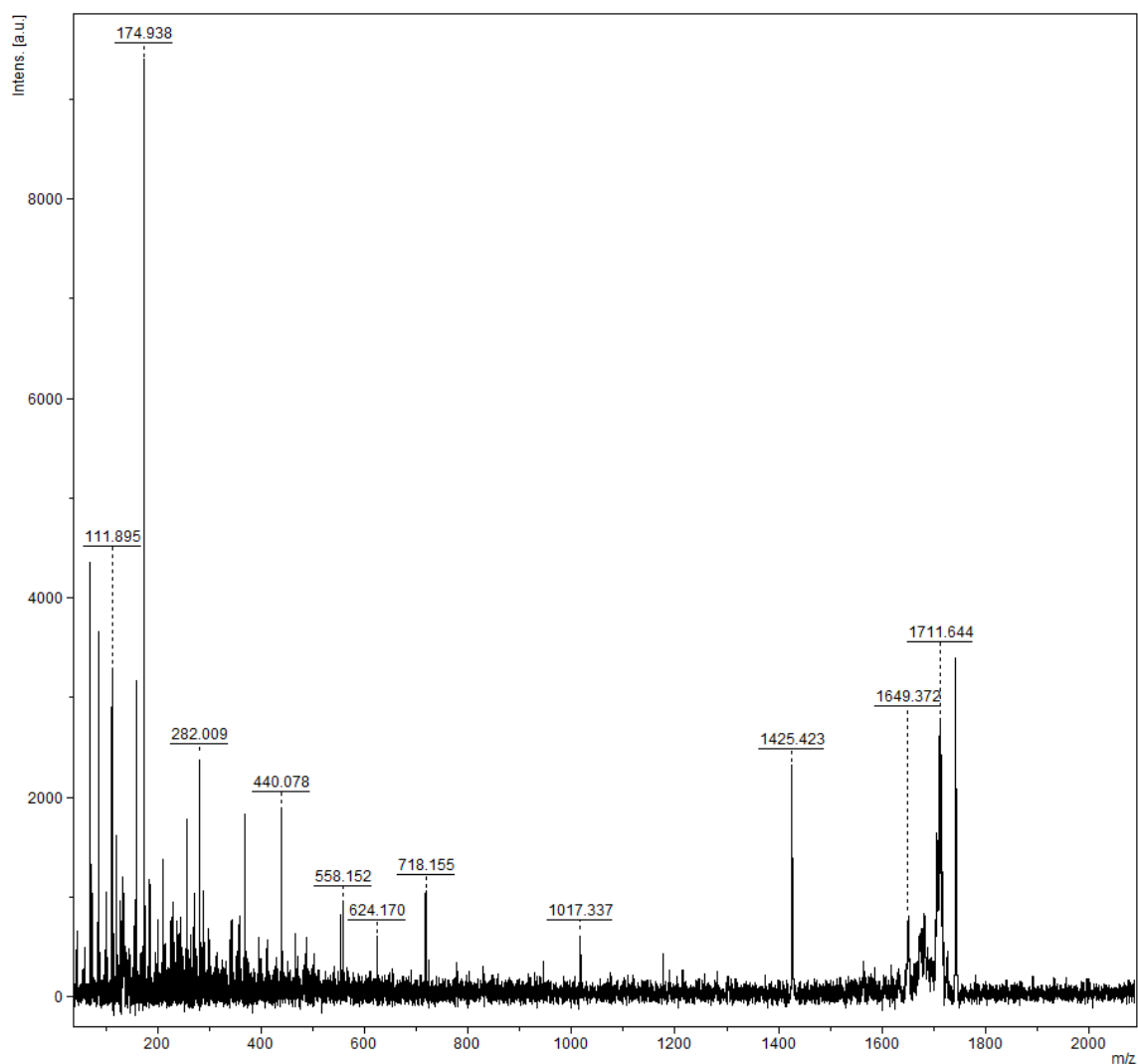
Espectro de massa gerado para amostra (1) de TcCSB: o eixo X representa a relação massa/carga (Dalton) da proteína encontrada e o eixo Y representa intensidade relativa. Os números acima de cada pico representam a massa de cada analito encontrado na faixa de 200 a 2.250 m/z.

3 – Espectro de massa da amostra número 2 para TcCSB por MS/MS.



Espectro de massa gerado para amostra (2) de TcCSB: o eixo X representa a relação massa/carga (Dalton) da proteína encontrada e o eixo Y representa intensidade relativa. Os números acima de cada pico representam a massa de cada analito encontrado na faixa de 200 a 2.250 m/z.

4 – Espectro de massa da amostra número 3 para TcCSB por MS/MS.



Espectro de massa gerado para amostra (3) de TcCSB: o eixo X representa a relação massa/carga (Dalton) da proteína encontrada e o eixo Y representa intensidade relativa. Os números acima de cada pico representam a massa de cada analito encontrado na faixa de 200 a 2.250 m/z.