## UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

### MARIA BEATRIZ DOS SANTOS MOTA

Estudo das vias de reparo do DNA, em resposta ao estresse oxidativo, em larvas do mosquito Aedes aegypti

### Maria Beatriz dos Santos Mota

Estudo das vias de reparo do DNA, em resposta ao estresse oxidativo, em larvas do mosquito Aedes aegypti

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pósgraduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Rafael Dias Mesquita

Rio de Janeiro 2019 Dedico esse trabalho aos meus pais Claudio Mota e Barbara Mota, a minha irmã Maria Fernanda Mota, e ao meu noivo Fabrício Bucher as pessoas mais importantes da minha vida, a quem amo incondicionalmente.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria, em primeiro lugar, de agradecer a Deus por ter me abençoado com a melhor família do mundo e por sempre guiar meus passos, me mostrando o melhor caminho a trilhar.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Professor Rafael Mesquita, por ter confiado no meu trabalho, por toda paciência que teve comigo desde o mestrado e pelo apoio. Muito obrigada por todos os ensinamentos, foi uma honra ter tido a oportunidade de ter sido sua aluna.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Bioinformática, obrigada pelas discussões científica, pelos momentos de descontração e amizade que vocês me proporcionaram ao longo desses 4 anos de doutorado! Gostaria de agradecer principalmente ao Eloy e ao André pela amizade e ajuda fundamental nas etapas computacionais. Às queridas Stephanie e Pri Viana, minhas companheiras de transcriptoma, aprendi muito com vocês. À Pri Esteves pela amizade e por estar sempre disposta a me ajudar. À Thayany, minha aluna de IC que hoje é doutoranda, obrigada pela amizade que cultivamos ao longo desses 6 anos juntas. Vocês foram essenciais durante esta longa jornada.

Sou também muito grata ao Professor Mário Alberto (*in memoriam*) por ceder os ovos de *Aedes aegypti* e por ter mantido a colônia 0,7 para que eu pudesse finalizar os meus experimentos. Sua partida precoce foi, sem dúvida, uma grande perda.

Agradeço ao Professor Renato Sampaio e sua aluna de IC Thais Meseque Pereira, pelas análises de PCR quantitativo, que foram de suma importância para a finalização deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer à minha família, a base de tudo, devo a vocês tudo o que sou hoje! Muito obrigada ao meu pai Claudio, que sempre foi e sempre será meu grande exemplo e minha inspiração. Agradeço à minha mãe Barbara, por ser minha melhor amiga, companheira e por sempre me motivar e vibrar por cada vitória. Agradeço a minha irmã Maria Fernanda e meu cunhado Marcelo, obrigada pela amizade de vocês, saibam que vocês são fundamentais na minha vida! Por fim, agradeço ao meu noivo, Fabrício, por todo apoio, toda paciência e todo amor que me deu durante os 5 anos que estamos juntos. Vocês acreditaram em mim mesmo quando eu mesma não acreditava e me deram força para continuar, dedico essa conquista a vocês.

"Todos os seus sonhos podem se tornar realidade se você tiver a coragem de perseguilos." – Walt Disney

#### **RESUMO**

Mota, Maria Beatriz dos Santos. Estudo das vias de reparo do DNA, em resposta ao estresse oxidativo, em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

O Aedes aegypti é atualmente um dos insetos vetores de maior relevância no Brasil, devido a sua capacidade de transmitir dengue, Zika, Chikungunya febre amarela e Mayaro. A alimentação hematofágica dos insetos vetores representa um grande desafio oxidativo devido a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, quando em excesso, causam danos a estrutura do DNA. Danos ao DNA ocorrem frequentemente durante a vida celular, sendo detectadas e corrigidas por uma rede complexa, denominada resposta ao dano ao DNA (RDD). As vias de reparo do DNA têm sido amplamente estudadas em organismos modelo, porém pouco se sabe sobre estas vias em insetos vetores. Todavia, o crescente interesse em gerar insetos transgênicos exige amplo conhecimento da RDD, principalmente das vias de reparo de quebras na dupla fita (DSB). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estudar a RDD em A. aegypti. Portanto, primeiramente, as proteínas de RDD foram buscadas em A. aegypti através de métodos de bioinformática e, em seguida transcriptomas de larvas tratadas com 0,5 mM de paraquat durante 6h, 12h e 24h foram sequenciados. A análise dos transcriptomas identificou 1848 genes diferencialmente expressos, que foram agrupados em 5 blocos de perfis de expressão. Genes envolvidos em processos de detoxificação, na resposta ao estresse, no reparo de quebras na dupla fita, na mitofagia, na transcrição e metabolismo de aminoácidos apresentaram expressão aumentada mediante ao tratamento com paraquat. Ademais, genes relacionados a fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons apresentaram a expressão diminuída nas larvas tratadas, indicando que o paraquat influencia no metabolismo energético. Ortólogos de proteínas chave da RDD em humanos, como RAD51, PARP, ATM, ATR, DNAPKcs, XPC e LIG4, foram encontrados em A. aegypti, todavia não foram encontrados ortólogos para CSA, CSB, BRCA1, TP53BP1, POLß e LIG3, possivelmente impactando nas vias TC-NER, sinalização de quebra na dupla fita e SP-BER. Nos transcriptomas, foram encontrados diferencialmente expressos diversos genes relacionados a RDD como PARP1, XRCC1, XPC, HR23B, XPB, RAD50, KU80 e LIG4. Ademais a maioria dos genes de RDD teve sua expressão aumentada mediante ao tratamento com paraquat, evidenciando a ativação das vias de reparo mediante ao estresse oxidativo gerado pelo paraquat.

Palavras chave: vias de reparo do DNA, Aedes aegypti, paraquat, estresse oxidativo

#### ABSTRACT

Mota, Maria Beatriz dos Santos. Estudo das vias de reparo do DNA, em resposta ao estresse oxidativo, em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

Aedes aegypti is one of the most important insect vectors in Brazil due to its ability to transmit dengue, Zika, Chikungunya yellow fever and Mayaro. The blood-feeding behavior represents an oxidative challenge due to the formation of reactive oxygen species (ROS), that can cause DNA damage. The DNA structure is continuously subjected to damage due to the exposure to endogenous and exogenous genotoxic agents, and its integrity depends on the DNA damage response (DDR). This complex system has been widely studied in model organisms, but little is known about these pathways in insect vectors. However, the growing interest in generating transgenic insects requires extensive knowledge of DDR, especially the double-strand break repair (DSB) pathways. Thus, the objective of this work is to study the DDR in A. aegypti. Therefore, blast reciprocal methodology was used to search for DDR proteins in A. aegypti and then the RNA of A. aegypti larvae treated with paraguat 0.5 mM for 6h, 12h and 24h were sequenced by RNAseq. Transcriptome analysis identified 1848 differentially expressed genes, which were grouped into 5 expression profile clusters. Genes involved in detoxification processes, stress response, double-strand breaks repair, mitophagy, transcription and amino acid metabolism increased expression by treatment with paraquat. In addition, genes related to oxidative phosphorylation and electron transport chain decreased expression in treated larvae, indicating that paraquat influences energy metabolism. Key DDR protein orthologs such as RAD51, PARP, ATM, ATR, DNAPKcs, XPC and LIG4 were found in A. aegypti, however no orthologs were found for CSA, CSB, BRCA1, TP53BP1, POLβ and LIG3, impacting in the TC-NER, double-strand break signaling and SP-BER. In the transcriptomes, several DDR-related genes were differentially expressed, such as PARP1, XRCC1, XPC, HR23B, XPB, RAD50, KU80 and LIG4. In addition, most DDR genes increased the expression by paraquat treatment, showing the activation of DDR through oxidative stress generated by paraquat.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do A. aegypti.	. 17
Figura 2: Distribuição das arboviroses	. 20
Figura 3: Curva de sobrevivência de larvas de A. aegypti tratadas com diferentes	
concentrações de paraquat durante 24h	. 22
Figura 4: Curva DL50 para o tratamento de larvas de A. aegypti com paraquat durant	e
24h	. 22
Figura 5: Esquema da RDD	. 24
Figura 6: Sinalização de ATR após ssDNA.	. 25
Figura 7: Sinalização de DSBs	. 27
Figura 8: Via de reparo por recombinação homóloga (HR)	. 30
Figura 9: Junção não homóloga de pontas (NHEJ).	. 32
Figura 10: Via de reparo por erro de pareamento (MMR).	. 34
Figura 11: Via de reparo por excisão de base (BER) e reparo de quebras na fita simpl	les
(SSB)	. 38
Figura 12: Via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER)	. 41
Figura 13: Esquema da metodologia de blast recíproco	. 45
Figura 14: Esquema do preparo das bibliotecas de cDNA	. 48
Figura 15: Esquema do sequenciamento Illumina	. 49
Figura 16: Gel de agarose 1% utilizando corante gelred. A figura mostra apenas o ge	1
para um lote de amostras (controle, 6h, 12h e 12h). Padrão de peso de 1kb	. 55
Figura 17: Gráfico relacionando o número de reads removidos com o volume de dad	OS
limpos	. 57
Figura 18: Blocos de perfis de expressão dos 1848 genes diferencialmente expressos	. 59
Figura 19: Enriquecimento funcional - função molecular	. 62
Figura 20: Enriquecimento funcional - processos biológicos	. 63
Figura 21: Enriquecimento funcional - componente celular.	. 64
Figura 22: Enriquecimento funcional - classe proteica.	. 65
Figura 23: Enriquecimento funcional – vias	. 66
Figura 24: Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa	. 66
Figura 25: Perfil de expressão dos genes relacionados à cadeia transportadora de	
elétrons e fosforilação oxidativa em A. <i>aegypti</i>	. 67

Figura 26: Perfil de expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante em A.
aegypti
Figura 27: Sinalização de ATR - estresse de replicação em A. aegypti
Figura 28: Perfil de expressão dos genes da cascata de sinalização de ATR em A.
aegypti71
Figura 29: Sinalização de DSB em A. <i>aegypti</i> 73
Figura 30: Identificação da histona H2AX (H2Av) em A. aegypti
Figura 31: Perfil de expressão dos genes de sinalização de DSB em A. aegypti
Figura 32: Reparo por recombinação homóloga (HR) em A. aegypti
Figura 33: Perfil de expressão dos genes de HR em A. aegypti
Figura 34: Junção não homóloga de pontas (NHEJ) em A. aegypti
Figura 35: Perfil de expressão dos genes de NHEJ em A. aegypti
Figura 36: Reparo por erro de pareamento (MMR) em A. aegypti
Figura 37: Perfil de expressão dos genes de MMR em A. aegypti
Figura 38: Reparo por excisão de base (BER) em A. aegypti
Figura 39: Perfil de expressão dos genes de BER em A. aegypti
Figura 40: Reparo por excisão de nucleotídeo (NER) em A. aegypti
Figura 41: Perfil de expressão dos genes de NER em A. aegypti
Figura 42: Gráficos de qPCR para os genes diferencialmente expressos no grupo 1 95
Figura 43: Gráfico de qPCR para TOPBP1 diferencialmente expressa no grupo 2 96
Figura 44: Gráfico de qPCR para RFC1, diferencialmente expresso no grupo 4 96

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados no PCR quantitativo.	53
Tabela 2: Esquema da reação utilizada no PCR quantitativo	54
Tabela 3: Quantificação e razão 260/280 das amostras de RNA	55
Tabela 4: Resumo do resultado do Cutadapt.	56
Tabela 5: Resultado do alinhamento com Bowtie2.	58

# LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Função molecular 13	33
Anexo 2: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Processo biológico 13	34
Anexo 3: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Componente celular 13	34
Anexo 4: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Classe proteica	35
Anexo 5: Enriquecimento funcional do grupo 2 - Vias	35
Anexo 6: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Função molecular 13	36
Anexo 7: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Processo biológico 13	38
Anexo 8: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Componente celular 14	41
Anexo 9: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Classe proteica 14	42
Anexo 10: Lista de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de ATR em A.	
aegypti14	43
Anexo 11: Lista de proteínas envolvidas na sinalização de DSB em A. aegypti 14	44
Anexo 12: Lista de histonas H2A encontradas em A. aegypti 14	46
Anexo 13: Lista de proteínas de HR encontradas em A. aegypti 14	48
Anexo 14: Lista de proteínas de NHEL encontradas em <i>A_aegypti</i>	
There is a protonial de l'influe cheonitadas en l'in accordination in the	51
Anexo 15: Lista de proteínas de MMR encontradas em <i>A. aegypti.</i>	51 52
Anexo 15: Lista de proteínas de MMR encontradas em <i>A. aegypti.</i>	51 52 53

# SUMÁRIO

1.	INT	<b>TRODUÇÃO</b>	6
1	.1	Insetos vetores - Aedes aegypti1	6
	1.1.	.1. Arboviroses transmitidas pelo A. <i>aegypti</i>	7
	1.1.	.2. Desafio Oxidativo em insetos vetores	0
1	.1.2.	1. Sobrevivência de <i>A. aegypti</i> mediante ao tratamento com paraquat 2	1
1	.2.	Resposta ao dano ao DNA (RDD)	2
1.2.	1.	Sinalização por ATR - estresse de replicação2	4
1.2.	2.	Reparo de quebras na dupla fita do DNA (do inglês: <i>double-strand break</i> -DSB 26	6)
1	.2.2.	1. Sinalização de DSB - ATM	6
1 r	.2.2.1 ecom	2. Reparo por recombinação homóloga (do inglês: <i>Homologou nbination</i> - HR)	ıs 8
1 e	.2.2. nd jo	3. Reparo por junção não homóloga de pontas (do inglês: <i>non-homologou pining</i> - NHEJ)	ıs 0
1.2.	3.	Reparo por erro de pareamento (do inglês: mismatch repair - MMR)	3
1.2.	4.	Reparo por excisão de base (do inglês: <i>base excision repair</i> - BER)	5
1	.2.4.	1. Reparo de quebra na fita simples (do inglês: <i>single-strand break</i> - SSB) 3	6
1.	Rep	paro por excisão de nucleotídeo (do inglês: nucleotide excision repair - NER) 3	8
1	.3.	Vias de reparo em insetos 4	2
2.	OB.	JETIVO GERAL 4	3
2	.1.	Objetivos específicos 4	3
3.	ME	TODOLOGIA 4	4
3	.1.	Identificação de proteínas relacionados ao reparo do DNA em A. aegypti 4	4
3	.2.	Eclosão dos ovos	5
3	.3.	Extração e dosagem de RNA 4	6
3	.4.	Sequenciamento	7
3	.5.	Análise bioinformática dos transcriptomas 4	9

3.5.1	Controle de qualidade e limpeza
3.5.2.	Mapeamento dos <i>reads</i>
3.5.3.	Quantificação dos <i>reads</i>
3.5.4.	Análise de expressão diferencial
3.5.5.	Análise de perfis de expressão
3.5.6.	Enriquecimento funcional
3.6.	PCR quantitativo
4. RE	SULTADOS
4.1.	Extração e dosagem de RNA 54
4.2.	Análise dos transcriptomas
4.2.2.	Controle de qualidade e limpeza
4.2.3.	Mapeamento e quantificação dos <i>reads</i>
4.2.4.	Genes diferencialmente expressos
4.2.5.	Enriquecimento funcional
4.3.	Estudo das vias de reparo em A. aegypti
4.3.1.	Sinalização de ATR 69
4.3.1.	<ol> <li>Identificação de proteínas relacionados a sinalização de ATR em A. <i>aegypti</i></li> <li>69</li> </ol>
4.3.1.	2. Análise de perfil de expressão da via de sinalização de ATR 70
4.3.2.	Sinalização de DSB 71
4.3.2.	<ol> <li>Identificação de proteínas relacionados a sinalização de DSB em <i>A. aegypti</i></li> <li>71</li> </ol>
4.3.2.	2. Análise de perfil de expressão da via de sinalização de DSB 74
4.3.3.	Reparo por recombinação homóloga (HR)76
4.3.3.	1. Identificação de proteínas relacionados ao reparo por HR em A. aegypti 76
4.3.3.	2. Análise de perfil de expressão da via de reparo por HR 78
4.3.4.	Reparo por junção não homóloga de pontas (NHEJ) 82
4.3.4.	1. Identificação de proteínas relacionados a NHEJ em A. <i>aegypti</i>

4.3.4.2.	Análise de perfil de expressão de NHEJ em A. aegypti	83
4.3.5. Rej	paro por erro de pareamento (MMR)	84
4.3.5.1.	Identificação de proteínas relacionados a MMR em A. aegypti.	
4.3.5.2.	Análise de perfil de expressão de MMR	86
4.3.6. Via	a de reparo por excisão de base (BER)	87
4.3.6.1.	Identificação de proteínas relacionados a BER em A. aegypti	87
4.3.6.2.	Análise de perfil de expressão de BER	90
4.3.7. Via	a de reparo por excisão de nucleotídeo (NER)	
4.3.7.1.	Identificação de proteínas relacionados a BER em A. aegypti	
4.3.7.2.	Análise de perfil de expressão de NER	
4.4. PC	R quantitativo (qPCR)	
5. DISCU	ISSÃO	
5.1. Est	udo da RDD em A. <i>aegypti</i>	103
6. CONCI	LUSÃO	116
7. REFER	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8. ANEXO	)Ş	

# 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Insetos vetores - Aedes aegypti

Os insetos vetores são responsáveis pela transmissão de uma variedade de doenças infecciosas, que causam, em escala global, mais de 700 mil óbitos por ano (WHO, 2017). Destaca-se nesse grupo de insetos o mosquito *Aedes aegypti* devido a sua capacidade de transmitir as arboviroses dengue, Zika, Chikungunya, febre amarela e Mayaro (ALONSO-PALOMARES et al., 2019; POWELL, 2018).

O *A. aegypti* é um díptero, membro da família Culicidae, que é encontrado em regiões tropicais e subtropicais do planeta. Possui hábito diurno e encontra-se extremamente adaptado ao ambiente urbano, fator que contribui para o seu sucesso como inseto vetor (CLEMONS et al., 2010).

Por ser um inseto holometábolo, durante seu ciclo de vida, que compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto alado, o *A. aegypti* realiza metamorfose completa (figura 1). A fêmea deposita os ovos em criadouros contendo água, preferencialmente limpa, os quais podem permanecer viáveis por vários meses. Ao entrar em contato com a água, os ovos eclodem, originando as larvas, que se alimentam de material orgânico particulado, algas e microrganismos. As larvas possuem 4 estádios de crescimento, sendo a densidade populacional, temperatura e disponibilidade de alimento os fatores determinantes para a mudança de estádio. Após o quarto estádio larval, originam-se as pupas, fase na qual acontece a metamorfose e o organismo não se alimenta. O final da fase pupal ocorre com a emergência do mosquito e a transição do meio aquático para o terrestre (CLEMONS et al., 2010; SAÚDE., 2001).



Figura 1: Ciclo de vida do A. aegypti.

O ciclo se inicia com a deposição de ovos pelas fêmeas em criadouros contendo água. Ao entrar em contato com a água, os ovos eclodem, gerando às larvas, que possuem 4 estádios de crescimento. Após o final da fase larval, originam-se as pupas de onde emerge o mosquito, ocorrendo a transição do meio aquático para o terrestre Adaptado de <u>https://eu.biogents.com/aedes-aegypti-yellow-fever-mosquitoes/</u>.

#### 1.1.1. Arboviroses transmitidas pelo A. aegypti

A transmissão de arboviroses ocorre quando as fêmeas realizam o repasto sanguíneo para garantir o desenvolvimento e maturação dos ovos. Ao picar um indivíduo infectado a fêmea é contaminada, e após um período de incubação (que varia de acordo com o vírus), torna-se um vetor do mesmo sendo capaz de transmiti-lo através da picada (VALLE; NACIF PIMENTA; AGUIAR, 2016).

O *A. aegypti* é capaz de transmitir as arboviroses Dengue, Zika, Chikungunya, febre amarela e Mayaro tornando-o um vetor de grande importância médica.

A dengue atualmente infecta aproximadamente 390 milhões de pessoas por ano e estima-se que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estão sob o risco de contrair o vírus (figura 2A) (WHO, 2019a). No Brasil a dengue se estende por todo território, onde estão circulantes os quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), apenas no ano de 2018 mais de 200 mil casos prováveis da doença foram notificados (SVS/MS, 2019a). A infecção por dengue pode causar um quadro de dengue clássico, forma de baixa

letalidade, porém incapacitante, ou evoluir para a febre hemorrágica do dengue, forma grave e potencialmente letal (KHETARPAL; KHANNA, 2016). Devido à morbidade causada pela doença a dengue constitui um grande problema de saúde e econômico, principalmente em países em desenvolvimento (OVERCASH et al., 2015).

O vírus Zika (ZIKV), identificado inicialmente na década de 50 na África, teve sua circulação restrita a Ásia e África até 2007, quando um surto ocorreu na região da Micronésia. Em 2013 outro surto da doença foi identificado na Polinésia Francesa se alastrando para diversas ilhas do Pacífico (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Acredita-se que o ZIKV tenha sido introduzido no Brasil entre 2013 e 2014 e posteriormente se espalhado pelos países da América latina e Caribe (figura 2B) (ALBUQUERQUE et al., 2018). No Brasil, a disseminação do vírus culminou em um surto de Zika, iniciado em 2015, atingindo principalmente as regiões sudeste e nordeste, sendo Pernambuco o estado mais afetado. O surto de Zika no Brasil levou a um grande problema de saúde pública devido a relação da infecção por ZIKV com o nascimento de bebês com microcefalia, registrando de novembro de 2015 a dezembro de 2018 3332 casos confirmados de Zika congênita (SVS/MS, 2019b). Além da microcefalia, a infecção por Zika também pode ocasionar outras complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré (FARIA et al., 2016).

Semelhante ao ZIKV, o vírus Chikungunya (CHIKV) foi identificado na África, na década de 50, e durante um longo período apenas poucos surtos da doença foram notificados nos continentes africano e asiático (AZEVEDO; **OLIVEIRA**; VASCONCELOS, 2015). Entretanto, em 2005, o CHIKV reemergiu, se espalhando para as ilhas do oceano Índico, atingindo a Índia e outros países sul asiáticos em 2006 e causando um grande surto. Posteriormente, o CHIKV surgiu no norte da Itália, em 2007, tendo sido reportado mais de 200 casos de infecção autóctone (TAUIL, 2014). Em 2013, o CHIKV se disseminou para as Américas, chegando ao Brasil em 2014, se espalhando progressivamente por todo território brasileiro (figura 2C) (LIMA-CAMARA, 2016; NUNES et al., 2015). Em relação ao quadro clínico, a febre Chikungunya é uma doença potencialmente debilitante causando febre alta, mialgia, artralgia, exantema macular e prostração. Aproximadamente 70% dos indivíduos infectados apresentam os sintomas, número considerado alto em relação a outras arboviroses, e 40% a 80% dos pacientes podem desenvolver um quadro reumático crônico, impactando a qualidade de vida (ARROYO-ÁVILA; VILÁ, 2015; RUNOWSKA et al., 2018).

A febre amarela é endêmica em regiões de floresta tropical na África e América Latina, sendo transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* no ciclo silvestre e pelo *A. aegypti* em seu ciclo urbano. No Brasil, o último caso de febre amarela urbana foi registrado em 1942, entretanto casos esporádicos de febre amarela silvestre ainda ocorrem (MEEGAN, 2017). Recentemente, o Brasil passou por duas ondas de surto de febre amarela silvestre, a primeira ocorreu em 2016-2017 durante o período sazonal da doença (de dezembro a maio), atingindo 778 indivíduos e causando 262 óbitos. A segunda onda aconteceu em 2017-2018, novamente no período sazonal, registrando 1376 casos dos quais 483 evoluíram para óbito (WHO, 2019b). Os surtos ocorreram, principalmente, em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, e atingiram regiões que não eram consideradas de risco, ampliando a área onde a vacinação é recomendada (figura 2D) (CDC, 2018). Em fevereiro deste ano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu um alerta sobre uma possível nova onda de surto, devido ao registro de 36 casos da doença, com 8 mortes, no período de dezembro de 2018 a janeiro de 2019 (WHO, 2019b).



2019. Adaptado de CDC: https://wwwnc.cdc.gov/travel/files/zika-areas-of-risk.pdf. (C) Países e territórios reportaram transmissão autóctone de Chikungunya, 2018. Adaptado de CDC: que https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/Chik\_World\_Map\_05-29-18-P.pdf. (D) Recomendação para Américas, 2018. CDC: vacinação contra febre amarela nas Adaptado de https://wwwnc.cdc.gov/travel/files/map3-15.pdf.

#### 1.1.2. Desafio Oxidativo em insetos vetores

Os organismos estão diariamente expostos a fatores que acarretam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a respiração aeróbia a principal fonte endógena de EROs. Fatores exógenos como a exposição à radiação ionizante, a radiação ultravioleta (UV) e substâncias químicas oxidantes, também acarretam na formação de EROs (KRYSTON et al., 2011).

Nos insetos vetores o hábito hematofágico, realizado pelas fêmeas, contribui para o aumento da produção de EROs, representando um grande desafio oxidativo para esses insetos. Isso ocorre devido a digestão da hemoglobina no trato digestivo, liberando o grupamento prostético heme, o qual torna-se tóxico quando livre de sua fração protéica devido ao seu potencial pró-oxidante (OLIVEIRA et al., 2011; PAIVA-SILVA et al., 2006). Além disso, a degradação do heme pela enzima heme oxigenase promove a liberação de ferro, o qual é capaz de formar EROs através da reação de Fenton (LIMA et al., 2012; SADRZADEH et al., 1984).

As larvas também podem sofrer com o estresse oxidativo em virtude da ação de poluentes, metais pesados e metabólitos de plantas presentes nos criadouros, além da incidência de radiação UV (PEREZ; NORIEGA, 2014; TETREAU et al., 2014).

Baixas quantidades de EROs auxiliam em diversos processos biológicos como transdução de sinal e na imunidade de insetos (DIAZ-ALBITER et al., 2012; MOLINA-CRUZ et al., 2008). O estresse oxidativo ocorre em virtude do desequilíbrio entre a quantidade de EROs e as defesas antioxidantes, induzindo a peroxidação de lipídeos e gerando danos às membranas plasmáticas, proteínas e ao DNA (KRYSTON et al., 2011). A ação de EROs no DNA pode ocasionar quebras na fita simples (SSB), quebras na dupla fita (DSB), além da oxidação de bases nitrogenadas e formação de sítios abásicos (CALDECOTT, 2008; LIEBER, 2011).

#### 1.1.2.1. Sobrevivência de *A. aegypti* mediante ao tratamento com paraquat

O paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium) é um herbicida com potencial ação pró-oxidante, sendo capaz de induzir o estresse oxidativo através do aumento na produção de radicais livres, associado à depleção dos mecanismos antioxidantes. Devido a sua capacidade em gerar EROs, este herbicida é comumente empregado em estudos de estresse oxidativo (RZEZNICZAK et al., 2011). A produção de EROs mediada por paraquat ocorre durante o ciclo redox, onde sofre redução formando o radical PQ<sup>+</sup> através da oxidação de NAD(P)H a NAD(P)<sup>+</sup> pela NAD(P)H oxidase. O radical PQ<sup>+</sup> é, imediatamente, re-oxidado a PQ<sup>2+</sup> com a transferência de um elétron para o oxigênio molecular, gerando ânion superóxido (O<sup>2-</sup>). A redução subsequente do O<sup>2-</sup> pela superóxido dismutase (SOD) forma peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais hidroxila (-OH), os quais podem ser potencialmente danosos (FUKUSHIMA et al., 2002; GAWARAMMANA; BUCKLEY, 2011).

Estudo de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* mediante ao estresse oxidativo, gerado pelo paraquat, já foram conduzidos pelo nosso grupo. O tratamento com paraquat, em larvas no estágio L3, apresenta resposta dose-tempo dependente, ou seja, a mortalidade aumenta à medida que se aumenta a concentração e o tempo de exposição

das larvas (figura 3). A DL50 (concentração necessária para matar 50% das larvas) do paraquat em 24h de tratamento também foi medida pelo nosso grupo, sendo igual a 1mM (figura 4) (MOTA, 2015).



Figura 3: Curva de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* tratadas com diferentes concentrações de paraquat durante 24h Obtido de (MOTA, 2015).



Figura 4: Curva DL50 para o tratamento de larvas de *A. aegypti* com paraquat durante 24h Obtido de (MOTA, 2015).

1.2.Resposta ao dano ao DNA (RDD)

A estrutura do DNA está constantemente sujeita a danos que podem ocasionar mutações, câncer, morte celular e até mesmo levar a falência do organismo (JACKSON; BARTEK, 2009). As lesões à estrutura do DNA podem ocorrer em virtude de fatores endógenos como a incorporação errônea de um nucleotídeo durante a replicação; alterações espontâneas das bases acarretando em desaminação, depurinação ou depirimidinação; e a exposição a agentes genotóxicos derivados do metabolismo, como EROs (CICCIA; ELLEDGE, 2010).

Além de fatores endógenos, a exposição a agentes genotóxicos exógenos também leva ao aparecimento de danos no DNA. Destaca-se entre as causas ambientais a radiação ionizante que gera lesão de forma direta e pela indução de reações que formam EROs; a radiação ultravioleta que acarreta na formação de dímeros de pirimidina; e uma diversidade de substâncias químicas naturais ou sintéticas que são capazes de se ligar a estrutura do DNA como fármacos antineoplásicos, agentes alquilantes e toxinas (CICCIA; ELLEDGE, 2010; ROOS; THOMAS; KAINA, 2016).

Para manter a integridade do genoma os organismos desenvolveram um complexo sistema de mecanismos denominado resposta ao dano ao DNA (RDD), que engloba as vias de sinalização e reparo do dano. A RDD é responsável por detectar alterações na estrutura do DNA, sinalizar e ativar as vias de reparo que objetivam corrigir o dano, além de ativar mecanismos de controle do ciclo celular e de apoptose de forma a eliminar mutações potencialmente danosas (SIRBU; CORTEZ, 2013).

Os mecanismos de RDD são coordenados por proteínas sensoras, mediadoras, transdutoras, e efetoras (figura 5), sendo as quinases *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *ATM and Rad3-related* (ATR), *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit* (DNAPKcs) as principais transdutoras de sinal (CICCIA; ELLEDGE, 2010). ATM, ATR e DNAPKcs pertencem à família fosfoinositídeo 3-quinase (PIKKs) e são primordiais para sinalização precoce do dano, fosforilando proteínas efetoras que ativam as respostas celulares necessárias para impedir a replicação do DNA e a divisão celular antes que o dano seja corrigido. ATM e DNAPKcs estão envolvidas no reparo de quebras de fita dupla (*double-strand break* - DSBs) enquanto a ATR é ativada por uma variedade de danos, reconhecendo regiões de DNA de fita simples (*single-strand DNA* - ssDNA) (AWASTHI; FOIANI; KUMAR, 2016; BLACKFORD; JACKSON, 2017; JETTE; LEES-MILLER, 2015).





As proteínas envolvidas na RDD podem ser classificadas em sensoras, mediadoras, transdutores e efetores. As sensoras detectam o dano ao DNA iniciando a cascata de sinalização e conduzindo o sinal para as transdutoras. A interação entre as mediadoras e transdutoras amplifica o sinal e facilita a ativação das efetoras culminando no arresto do ciclo celular, ativação transcricional de genes, reparo do DNA, senescência e apoptose.

#### 1.2.1. Sinalização por ATR - estresse de replicação

A via de sinalização por ATR é ativada mediante o reconhecimento de regiões de DNA de fita simples ligado ao complexo RPA (ssDNA-RPA). Essa estrutura é gerada pelo estresse de replicação, que ocorre devido ao desacoplamento entre a DNA helicase e polimerase na forquilha de replicação, e durante a ressecção dos segmentos de DNA que sofreram DSBs. O recrutamento de ATR ocorre através da ligação de sua proteína de interação *ATR-interacting protein* (ATRIP) a RPA-ssDNA (ZOU; ELLEDGE, 2003). Em seguida, RPA-ssDNA também recruta o complexo RAD17/RFC, responsável pelo posicionamento do complexo RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) na região de junção entre DNA de dupla fita (*double-strand DNA* - dsDNA) e ssDNA (ZOU; LIU; ELLEDGE, 2003). O complexo 9-1-1 recruta TOPBP1 através da ligação entre a pSer387 (serina fosforilada) da subunidade RAD9 e os domínios BRCTs1 e 2 de TOPBP1 (RAPPAS; OLIVER; PEARL, 2011). Posteriormente, TOPBP1 interage com ATRIP e ATR

promovendo a completa ativação de ATR, que fosforila proteínas efetoras responsáveis por ativar as respostas necessárias para correção do dano. (KUMAGAI et al., 2006; MORDES et al., 2008) (figura 4). A fosforilação da quinase CHK1 por ATR acarreta a degradação de CDC25A, culminando na inibição da atividade de CDK e, consequentemente, no arresto do ciclo celular, permitindo que o dano seja reparado (figura 6).



#### Figura 6: Sinalização de ATR após ssDNA.

A cascata se inicia com o recrutamento de ATR (através da interação com ATRIP) e do complexo RAD17-RFC, para a região de ssDNA, através de RPA. Em seguida, o complexo 9-1-1 é posicionado na região de junção ssDNA/dsDNA pelo complexo RAD17-RFC. A ligação entre RAD9 e TOPBP1 favorece a interação entre ATR, ATRIP e TOPBP1 promovendo a completa ativação de ATR, que fosforila proteínas efetoras culminando na resposta apropriada para correção do dano.

# **1.2.2.** Reparo de quebras na dupla fita do DNA (do inglês: *double-strand break* - DSB)

DSBs são lesões potencialmente danosas que podem acarretar perda de informação genética, instabilidade genômica e ativar mecanismos de apoptose (IYAMA; WILSON, 2013). As DSBs podem ser geradas devido a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), da radiação ionizante, como consequência de falhas durante a replicação e naturalmente durante a meiose e a recombinação V(D)J (processo de recombinação genética que ocorre durante a maturação de células B e T) (CHANG et al., 2017; MLADENOV et al., 2016). A sinalização de quebras na dupla fita envolve ativação da quinase transdutora de sinal ATM e a escolha entre o reparo recombinação homóloga (HR) ou por junção não homóloga de pontas (NHEJ) (RODGERS; MCVEY, 2016).

### 1.2.2.1. Sinalização de DSB - ATM

A sinalização de DSBs (figura 7) se inicia com a detecção da quebra e ativação de ATM pelo complexo MRN, composto por RAD50, NBN e MRE11 (OH; SYMINGTON, 2018; ZANNINI; DELIA; BUSCEMI, 2014). ATM ativada promove a fosforilação de CHK2 e p53, regulando o ciclo celular, senescência e apoptose (CICCIA; ELLEDGE, 2010). ATM também fosforila uma variedade de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de DSBs, incluindo as histonas adjacentes H2A/H2AX, gerando gamma-H2A (yH2A) e gamma-H2AX (yH2AX), contribuindo para formação de foco (BLACKFORD; JACKSON, 2017; CHATTERJEE; WALKER, 2017; LAVIN et al., 2015). A fosforilação de H2AX/H2A na serina 139 permite o reconhecimento e ligação de mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1), que promove a amplificação da cascata de sinalização de ATM e recruta as E3 ubiquitina ligases RNF8 e RNF168, responsáveis por catalisar a poliubiquitinação de H2AX/H2A (COSTER; GOLDBERG, 2010; DOIL et al., 2009; HUEN et al., 2007). A ubiquitinação de H2AX/H2A é importante para o recrutamento do complexo BRCA1-A (formado pelo heterodímero BRCA1-BARD1 associado às proteínas, RAP80, ABRAXAS, BRCC3, BRE, BABAM1) e de TP53BP1 (STEWART et al., 2009; WANG; ELLEDGE, 2007). A escolha entre HR e NHEJ depende da fase do ciclo celular (CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016). Nas fases S e G2, CtIP se associa a BRCA1 e ao complexo MRN estimulando a ressecção dos terminais, promovendo HR (ESCRIBANO-DÍAZ et al., 2013; SARTORI et al., 2007), enquanto em G1 a interação entre TP53BP1, RIF1 e PAXIP1 inibe a ressecção favorecendo a NHEJ (PANIER; BOULTON, 2014).





A cascata se inicia com o reconhecimento da DSB pelo complexo MRN, ativando ATM, fosforilando CHK2 e p53 acarretando o controle do ciclo celular, senescência e apoptose. ATM também fosforila MDC1, responsável por recrutar RNF8 e RNF168, que catalisam a poliubiquitinação de H2AX/H2A, importante para o recrutamento do complexo BRCA1-A e de TP53BP1. Nas fases S e G2, CtIP se associa a BRCA1 e ao complexo MRN estimulando a ressecção dos terminais, promovendo HR, enquanto em G1 a interação entre TP53BP1, RIF1 e PAXIP1 inibe a ressecção favorecendo a NHEJ.

# 1.2.2.2. Reparo por recombinação homóloga (do inglês: *Homologous recombination* - HR)

A HR está diretamente envolvida na manutenção da integridade do genoma, sendo responsável por reparar DSBs que ocorrem em virtude do colapso da forquilha de replicação. A HR utiliza a região homóloga da cromátide irmã como molde para o reparo, conferindo maior acurácia ao processo, evitando erros e perdas (WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018). Dessa forma, HR ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular, etapas onde o cromossomo homólogo se encontra disponível para servir como molde (RODGERS; MCVEY, 2016).

A primeira etapa de HR (figura 8) consiste na ressecção das extremidades de DSB, que é iniciada por CtIP em associação com BRCA1 e o complexo MRN (CHEN et al., 2008; SARTORI et al., 2007). Posteriormente, a exonuclease EXO1 ou a endonuclease DNA2 promove uma extensa ressecção das extremidades de DSB, em um processo facilitado pelas helicases BLM ou WRN (NIMONKAR et al., 2008, 2011; STURZENEGGER et al., 2014). Os segmentos de ssDNA gerados são estabilizados por RPA, ativando a sinalização de ATR (descrito em 1.2.1.) (IYAMA; WILSON, 2013).

O passo seguinte da via consiste na formação de filamentos capazes de invadir a cromátide irmã. Dessa forma a proteína *breast cancer 2, early onset* (BRCA2) em cooperação com PALB2, medeia a substituição de RPA por *DNA repair protein RAD51* (RAD51) (BUISSON et al., 2010; DRAY et al., 2010). A proteína RAD51 desempenha papel central em HR por formar os filamentos de nucleoproteínas necessários para a invasão e a busca por regiões homólogas (HELLEDAY et al., 2007). Os filamentos são estabilizados pelos parálogos RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 e XRCC3) e invadem a cromátide-irmã em cooperação com RAD54 (GOYAL et al., 2018; TAYLOR et al., 2015).

Após a invasão, as DNA polimerases replicativas (POL  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ) ou de transcrição (POL  $\eta$ ,  $\kappa$ ) estendem a fita de DNA gerando uma estrutura denominada *D-loop*, que pode ser resolvida por três vias: reparo de quebra na fita dupla (*double-strand break repair* - DSBR), anelamento de fita dependente de síntese (*synthesis-dependent strand annealing* - SDSA) ou replicação induzida por quebra (*break induced replication* - BIR) (SEBESTA et al., 2013).

Na DSBR o *D-loop* é processado através da formação de uma estrutura intermediária denominada junções *Holliday*, que pode ser dissolvida ou resolvida. A

dissolução ocorre por meio do complexo BTR formado por *Bloom's syndrome helicase* (BLM), *topoisomerase III* α (TOP3A), *RecQ Mediated Genome Instability 1* (RMI1) e 2 (RMI2), formando produtos sem *crossing over*, enquanto a resolução envolve as nucleases SLX1-SLX4 e MUS81-EME1 ou GEN1 e pode gerar produtos com ou sem *crossing over* (MATOS; WEST, 2014; WEST et al., 2016; WYATT et al., 2013).

Na SDSA, a fita invasora se dissocia da cromátide irmã e anela com a fita complementar na outra extremidade da quebra, resultando em produtos sem *crossing over* (Krejci et al., 2012). As helicases RTEL1 ou BLM participam desta via (BARBER et al., 2008; URINGA et al., 2012).

Na sub via BIR, a forquilha de replicação é montada após a formação do *D-loop* e o braço inteiro do cromossomo é sintetizado (MALKOVA, 2018). A BIR foi bastante estudada em leveduras, sendo realizada pela Pol 32 (ortólogo POLD3) e pelas helicases *ATP-dependent DNA helicase PIF1* (PIF1) e *minichromosome maintenance complex component 2-7* (MCM2-7) (SAKOFSKY; MALKOVA, 2017; WILSON et al., 2013).

As DSBs podem ser reparadas por uma via independente de RAD51, denominada anelamento de fita simples (SSA). Na SSA os terminais complementares, gerados pela extensa ressecção de DSB, são anelados em um processo mediado por RAD52 (BHARGAVA; ONYANGO; STARK, 2016; GRIMME et al., 2010).



Figura 8: Via de reparo por recombinação homóloga (HR).

A HR se inicia com a ressecção das extremidades de DSB por CtIP em associação com BRCA1 e o complexo MRN. Em seguida, a EXO1 ou DNA2 promove uma extensa ressecção, em um processo facilitado por BLM ou WRN. Posteriormente, com auxílio de BRCA2 e PALB2, RAD51 forma os filamentos de nucleoproteínas, os quais são estabilizados pelos parálogos de RAD51 e invadem a cromátide-irmã em cooperação com RAD54. A síntese da fita de DNA é catalisada por POL  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  ou  $\kappa$ , gerando uma estrutura denominada D-loop, que pode ser resolvida pelas vias de reparo de quebra na fita dupla (DSBR), anelamento de fita dependente de síntese (SDSA) ou replicação induzida por quebra (BIR). As DSBs podem ser reparadas por uma via independente de RAD51, denominada anelamento de fita simples (SSA).

# 1.2.2.3. Reparo por junção não homóloga de pontas (do inglês: *non-homologous end joining* - NHEJ)

A NHEJ é a principal via de reparo de quebra de dupla fita em eucariotos, sendo predominante na fase G1 do ciclo celular (CHANG et al., 2017). Desempenha um papel importante na recombinação V(D)J durante o desenvolvimento dos linfócitos, além de

participar da manutenção da integridade do genoma (IYAMA; WILSON, 2013; PANNUNZIO; WATANABE; LIEBER, 2018).

A primeira etapa de NHEJ (figura 9) consiste na ligação do complexo Ku, formado por *x-ray repair cross-complementing 6* (KU70) e *x-ray repair cross-complementing 5* (KU80), a DSB, prevenindo a ressecção das extremidades. O complexo Ku também recruta a quinase *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)* formando um complexo multiproteico, denominado DNA-PK, responsável por alinhar e aproximar as extremidades da DSB (DAVIS; CHEN; CHEN, 2014; SUN et al., 2012).

Em seguida, quando os terminais não são complementares, a DNAPKcs fosforila a endonuclease ARTEMIS, responsável por processar as extremidades para encontrar nucleotídeos coesivos (MOSCARIELLO et al., 2015). Embora ARTEMIS seja a principal endonuclease envolvida em NHEJ, outras proteínas podem participar, em menor escala, da remoção de nucleotídeos das extremidades de DSBs, como *PNKP-like factor* (APLF), *polynucleotide kinase/phosphatase* (PNKP), *aprataxin* (APTX), *tyrosyl DNA phosphodiesterase 1* (TDP1) e *tyrosyl DNA phosphodiesterase 2* (TDP2) (CHANG et al., 2017; GÓMEZ-HERREROS et al., 2013; HEO et al., 2015). APLF também desempenha um importante papel em NHEJ, uma vez que a interação com o complexo Ku, facilita o recrutamento de XRCC4-LIG4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4 - DNA ligase 4*) e *non-homologous end-joining factor 1* (XLF) (GRUNDY et al., 2013). Além disso, APLF também promove a retenção deste complexo na cromatina acelerando a etapa de ligação do DNA (ILES et al., 2007; RULTEN et al., 2011).

O processamento das extremidades de DSB continua com as polimerases da família X, que são responsáveis por adicionar nucleotídeos necessários para restauração da dupla fita. POL  $\mu$  e POL  $\lambda$  são membros desta família, e ambos podem incorporar nucleotídeos de maneira independente e dependente de um molde (CHANG et al., 2017). Outro membro da família Pol X, *deoxynucleotidyl transferase* (TDT), também participa de NHEJ, sendo expressa principalmente em linfócitos imaturos, desempenhando importante papel na recombinação V(D)J (FRIT et al., 2019).

Na última etapa de NHEJ, o complexo XRCC4-LIG4 interage com XLF para catalisar a ligação das extremidades, finalizando o reparo (FATTAH et al., 2010; PANNUNZIO; WATANABE; LIEBER, 2018).



Figura 9: Junção não homóloga de pontas (NHEJ).

A NHEJ se inicia com a detecção da DSB pelo complexo KU (KU80 e KU70), que recruta a quinase DNA-PKcs responsável por alinhar e aproximar as extremidades da DSB. Em seguida, a DNA-PKcs fosforila ARTEMIS, endonuclease envolvida no processamento das extremidades para encontrar nucleotídeos coesivos. As polimerases da família X (POL  $\mu$  e POL  $\lambda$ ) também participam desse processo. Na última etapa da via as extremidades são reconectadas pelo complexo formado por Lig4, XRCC4 e XLF.

#### 1.2.3. Reparo por erro de pareamento (do inglês: mismatch repair - MMR)

A MMR é responsável por reconhecer e reparar bases mal pareadas e *loops* causados por inserções e deleções, que ocorrem durante a replicação e escapam da detecção pela DNA polimerase (LIU; KEIJZERS; RASMUSSEN, 2017).

A MMR (figura 10) é uma via bastante conservada, sendo orquestrada, em procariotos pelas proteínas MutS e MutL. O homodímero MutS reconhece o par de base mal pareado, enquanto o homodímero MutL é recrutado para o local da lesão formando um complexo com MutS, sinalizando para o início da excisão do dano (GROOTHUIZEN; SIXMA, 2016). Em eucariotos, homólogos de MutS foramam os heterodímeros funcionais MutSa (MSH2-MSH6) e MutSβ (MSH2-MSH3) (FRIEDHOFF; LI; GOTTHARDT, 2016). Bases mal pareadas, e inserções ou deleções de até duas bases são reconhecidos por MutS $\alpha$ , enquanto as inserções e deleções que contém mais de duas bases são detectados por MutS $\beta$ . Os homólogos de MutL formam três heterodímeros funcionais, sendo eles: MutL $\alpha$  (MLH1-PMS2), MutL $\beta$  (MLH1-MLH3) e MutL $\gamma$  (MLH1-PMS1), entretanto MutL $\alpha$  é o principal envolvido em MMR (ERIE; WENINGER, 2014; WESSBECHE; BRIEGER, 2018).

Para que o reparo prossiga com sucesso, antes de iniciar a excisão a maquinaria de MMR precisa detectar a fita recém-sintetizada. Em eucariotos, a fita líder é reconhecida pela ligação de PCNA, que direciona a MutL $\alpha$  para o local onde a incisão deve ocorrer, enquanto os fragmentos de Okazaki servem como marcadores da fita retardatária (ERIE; WENINGER, 2014; NICK MCELHINNY; KISSLING; KUNKEL, 2010; PLUCIENNIK et al., 2010). Em seguida, o mau pareamento é removido através da excisão na fita, ação orquestrada pela EXOI em cooperação com PCNA. A excisão do pareamento errôneo por EXO1 cria um *gap* de ssDNA que é imediatamente protegido por RPA (LIBERTI et al., 2011). A síntese de uma nova sequência nucleotídica é realizada pela DNA polimerase  $\delta$  (POL $\delta$ ) e a incorporação da nova sequência a fita de DNA é realizada pela *DNA ligase 1* (LIG1) (LIU; KEIJZERS; RASMUSSEN, 2017; WESSBECHE; BRIEGER, 2018).



Figura 10: Via de reparo por erro de pareamento (MMR).

A MMR se inicia com a detecção do mal pareamento através dos heterodímeros MutS e MutL. Em seguida, o processamento consiste na remoção do erro através da EXOI. A de síntese e substituição do fragmento danificado é realizada por POL  $\delta$ . Por último, a LIG1 catalisa a ligação restaurando o DNA.

#### **1.2.4.** Reparo por excisão de base (do inglês: *base excision repair* - BER)

A BER é responsável por reparar lesões nas bases nitrogenadas causadas por oxidação, alquilação, desaminação, além de reparar sítios abásicos e quebras na fita simples (BROOKS et al., 2013; MARKKANEN, 2017).

A BER (figura 11) se inicia com o reconhecimento e excisão da base danificada por uma DNA glicosilase, enzima que catalisa a clivagem de ligações N-glicosídicas e que pode ser monofuncional ou bifuncional. As glicosilases monofuncionais realizam apenas a remoção da base levando a formação de um sítio abásico, enquanto as glicosilases bifuncionais possuem também atividade de liase. Dessa forma, as glicosilases bifuncionais clivam o DNA na posição 3', após o sítio abásico, formando uma quebra na fita simples (SSB) contendo, na extremidade 3', um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado (3'-PUA) ou um grupamento fosfato (3'-P) (SHAFIROVICH; GEACINTOV, 2017; WALLACE; MURPHY; SWEASY, 2012).

As DNA glicosilases são bastante específicas em relação ao seu substrato, sendo seletivas em relação ao tipo de base danificada que reconhecem. Em humanos existem onze glicosilases: uracil DNA N-glycosylase (UNG), thymine DNA glycosylase (TDG), single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase (SMUG), methyl-CpGbinding domain 4 (MBD4), 3-methylpurine glycosylase (MPG), 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG), MutY homolog DNA glycosylase (MUTY), endonuclease III-like (NTH), endonuclease VIII-like 1 (NEIL1), endonuclease VIII-like 2 (NEIL2) e endonuclease VIII-3 (NEIL3). As glicosilases UNG, SMUG, TDG, e MBD4 são monofuncionais e membros da superfamília uracil DNA glicosidases (UDG) (DIZDAROGLU; COSKUN; JARUGA, 2017; KIM; WILSON, 2012). UNG e SMUG catalisam a excisão de uracil oriundo da desaminação da cistina, enquanto TDG e MBD4 removem derivados de pirimidina mal pareados (JACOBS; SCHÄR, 2012). A MPG é uma glicosilase monofuncional responsável pela detecção e remoção de bases alquiladas (JACOBS; SCHÄR, 2012). As glicosilases OGG, MUTY, NTH, NEIL1, NEIL2 e NEIL3 são responsáveis por remover danos oxidativos. MUTY é monofuncional e catalisa a excisão de adenina pareada com guanina, citosina ou 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), uma importante lesão oxidativa formada através da oxidação da guanina (WHITAKER et al., 2017). OGG é bifuncional e responsável pela excisão de 8-oxoG (BA; BOLDOGH, 2018). NTH, NEIL1, NEIL2 e NEIL3 catalisam a remoção de danos causados pela oxidação de pirimidinas (SHAFIROVICH; GEACINTOV, 2017).

O próximo passo de BER consiste na ação da *AP endonuclease* (APE), que cliva o DNA na posição 5' imediatamente após o sítio abásico, formando os terminais 5' desoxirribose fosfato (5'-dRP) e 3'-hidroxila (3'-OH). Quando a base é removida por uma glicosilase bifuncional, APE e *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (PNKP) são responsáveis por substituir 3'-PUA e 3'-P por uma hidroxila (3'-OH), respectivamente (CARTER; PARSONS, 2016).

Após a detecção, remoção da base danificada e processamento das extremidades, a BER pode continuar por duas vias: a via curta (SP-BER) e a via longa (LP-BER).

Na via curta a DNA polimerase  $\beta$  (POL  $\beta$ ) remove o 5'-dRP e preenche o *gap* inserindo um novo nucleotídeo. O reparo é finalizado pelo complexo *X-ray repair cross-complementing protein 1 - DNA ligase 3* (XRCC1-LIG3), que catalisa a ligação das extremidades (WALLACE, 2014).

A BER procede pela via longa quando o grupamento da extremidade 5' não for substrato para Pol  $\beta$ . Nessa via, em torno de 2 a 10 nucleotídeos são deslocados da extremidade 3', e em seguida removidos pela *flap endonuclease* 1 (FEN1). Uma nova cadeia nucleotídica é sintetizada, geralmente pela Pol  $\delta$ ,  $\varepsilon$  ou  $\beta$  em cooperação com PCNA, e incorporada a fita pela *DNA ligase 1* (LIG1) (MARKKANEN, 2017). A via longa também é preferencial em situações de baixa concentração de ATP e durante a fase S do ciclo celular (IYAMA; WILSON, 2013).

1.2.4.1. Reparo de quebra na fita simples (do inglês: *single-strand break* - SSB)

As SSBs podem ocorrer devido a diversos fatores, como por exemplo a ação de EROs, como intermediários da maioria das vias de reparo, incluindo BER e através da parada abrupta da *topoisomerase 1* (TOP1) (IYAMA; WILSON, 2013).

Devido à variedade de mecanismos que podem gerar SSB, a composição química das extremidades 3' e 5' pode ser bastante diversa. As enzimas APE, PNPK (ambas já citadas), TDP1 e APTX são responsáveis pelo processamento das extremidades para gerar os terminais 3' e 5' apropriados (CALDECOTT, 2008).

A enzima TDP1 está envolvida no processamento de SSB gerada através da parada abrupta de TOP1. A TOP1 atua na remoção de DNA *supercoiling* que ocorre durante a replicação, criando uma incisão através da formação de um intermediário reversível com o DNA, denominado complexo de clivagem (TOP1cc). Porém, em certas condições, como a colisão com RNA ou DNA polimerases ou a proximidade com outros tipos de
lesões no DNA, podem converter TOP1cc em um intermediário irreversível, no qual a TOP1cc permanece covalentemente ligada ao terminal 3' da SSB (ABBOTTS; WILSON, 2017). A enzima TDP1 catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster entre a extremidade 3' e TOP1, removendo TOP1cc e gerando um 3'-P. Em seguida, PNPK converte os terminais 3'-P e 5'-OH em 5'-P e 3'-OH (MURAI et al., 2012).

A enzima APTX é responsável por remover o grupamento 5'-adenilato (5'-AMP), resultante de um processo de ligação malsucedido, que ocorre durante o reparo do DNA (AHEL et al., 2006). O 5'-AMP é um intermediário gerado, pela DNA ligase que, em condições normais, é removido durante a formação da ligação fosfodiéster. Entretanto, quando a DNA ligase encontra um grupamento "não ligável" no terminal 3', o processo é interrompido deixando o grupo AMP covalentemente ligado a extremidade 5' (SCHELLENBERG; TUMBALE; WILLIAMS, 2015). Devido a sua atividade de deadenilação, a ATPX converte o grupamento 5'-AMP em 5'-P, formando terminais que podem ser facilmente ligados (AHEL et al., 2006).



Figura 11: Via de reparo por excisão de base (BER) e reparo de quebras na fita simples (SSB). A BER tem início com o reconhecimento e excisão da base alterada, realizada por glicosidades, que podem ser mono ou bifuncionais. A próxima etapa consiste no processamento das extremidades pela endonuclease APE. A BER pode ocorrer através da via curta ou da via longa. Na via curta a síntese é orquestrada pela POL  $\beta$  e a ligação é catalisada pelo complexo XRCC1 e LIG3. Na via longa um fragmento de nucleotídeos é deslocado da exterminade 3' e removido por FEN1. POL  $\beta$ ,  $\delta$  ou  $\varepsilon$  sintetizam uma nova cadeia nucleotídica enquanto LIG1 catalisa a ligação.

### 1. Reparo por excisão de nucleotídeo (do inglês: nucleotide excision repair - NER)

A NER é responsável por reparar lesões volumosas, que distorcem a dupla hélice do DNA, grande parte ocasionadas por agentes ambientais (FAGBEMI; ORELLI; SCHÄRER, 2011). Alguns exemplos de danos exógenos reparados por NER são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e o fotoproduto (6-4) pirimidina-pirimidona (6-4PPs) gerados pela radiação ultravioleta (UV) (IYAMA; WILSON, 2013); e os adutos formados pela ligação de compostos químicos ao DNA, como benzopireno, cisplatina e aflatoxina (SPIVAK, 2015). A NER também repara danos endógenos, como por exemplo as ciclopurinas, lesão oxidativa gerada através da ação de EROs (MARTEIJN et al., 2014).

A primeira etapa de NER (figura 12) consiste no reconhecimento do dano, que pode ocorrer por duas sub vias distintas: reparo do genoma global (*global genomic repair* 

- GG-NER) e o reparo acoplado à transcrição (*transcription-coupled repair* - TC-NER). O local onde ocorreu a lesão determina qual sub via será utilizada, se o dano estiver em uma região que está sendo transcrita a TCR será ativada, caso esteja localizado em um domínio inativo o reparo irá acontecer via GGR (MU et al., 2018).

Na GG-NER o reconhecimento do dano se inicia pela ligação, a fita oposta a lesão, do complexo XPC, formado pela proteína sensora *xeroderma pigmentosum group C* (XPC), e as proteínas *UV excision repair protein RAD23 homolog B* (RAD23B) e *centrin-2* (CETN2) (MARTEIJN et al., 2014). Um segundo complexo, UV-DDB (XPE), formado pelas proteínas *DNA damage-binding protein 1* (DDB1), *DNA damage-binding protein 2* (DDB2), *cullin 4* (CUL4A ou CUL4B) e *RING-box protein 1* (RBX1), também se liga a fita oposta, sendo importante para reter as proteínas ao redor do dano (OH et al., 2011).

Na TC-NER a distorção na dupla hélice bloqueia a elongação da RNA polimerase, servindo como um sinal para o recrutamento das proteínas CSA e CSB (IYAMA; WILSON, 2013; MARTEIJN et al., 2014).

Após o reconhecimento da lesão, as duas sub vias, necessitam da mesma maquinaria enzimática. Dessa forma, o passo seguinte consiste no recrutamento do complexo TFIIH (JEPPESEN; BOHR; STEVNSNER, 2011). Este complexo de dez subunidades é composto por um núcleo contendo xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB), xeroderma pigmentosum complementation group D (XPD), general transcription factor IIH subunit 5 (TTDA), general transcription factor IIH subunit 1 (TFIIH1), subunit 2 (TFIIH2), subunit 3 (TFIIH3) e subunit 4 (TFIIH4), associado ao subcomplexo Cdk-activating-kinase (CAK), o qual é composto por cyclindependent kinase 7 (CDK7), cyclin H (CCNH) e CDK-activating kinase assembly factor (MNAT1) (COMPE; EGLY, 2016; FUSS; TAINER, 2011). As subunidades XPB e XPD são helicases responsáveis pela abertura da dupla fita de DNA em torno da lesão, facilitando o recrutamento de replication factor A (RPA) e xeroderma pigmentosum group A (XPA) (CAMBINDO BOTTO; MUÑOZ; MUÑOZ, 2018). RPA se liga à fita oposta a lesão para evitar a junção das fitas e protegê-la de nucleases, enquanto XPA desempenha função de verificação do dano, além de promover a liberação do complexo CAK, facilitando a formação do complexo de pré-incisão (DIDERICH; ALANAZI; HOEIJMAKERS, 2011; IYAMA; WILSON, 2013; MARTEIJN et al., 2014).

O próximo passo consiste na excisão do dano catalisada pelas endonucleases XPF-ERCC1 e *xeroderma pigmentosum group G* (XPG). O heterodímero XPF-ERCC1, formado pelas proteínas *xeroderma pigmentosum group F* (XPF) e *excision repair cross*-

*complementation group 1* (ERCC1), cliva a fita na posição 5', enquanto XPG possui atividade 3' (MU et al., 2018). O gap de, aproximadamente, 30 nucleotídeos é preenchido pela ação de uma DNA polimerase (Pol  $\delta$ ,  $\varepsilon$  ou  $\kappa$ ) em cooperação com *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) e *replication factor C* (RFC) (OGI et al., 2010), e a ligação é catalisada por LIG1 ou pelo complexo XRCC1-LIG3 (SPIVAK, 2015).



Figura 12: Via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).

A detecção do dano em NER pode ocorrer através do reparo do genoma global (GG-NER) ou acoplado à transcrição (TC-NER). Na GG-NER o complexo XPC e UV-DDB estão envolvidos no reconhecimento da lesão, enquanto na TC-NER essa função cabe as proteínas CSA e CSB. Após a detecção o complexo TFIIH é recrutado, sendo as subunidades XPB e XPD helicases que abrem o DNA em torno da lesão permitindo a incisão por XPG e XPF/ERCC1, removendo o oligonucleotídeo danificado. A síntese de um novo fragmento nucleotídico é catalisada por POL  $\delta$ ,  $\varepsilon$  ou  $\kappa$ , e o reparo é finalizado através da ligação das extremidades pela LIG1.

A RDD tem sido bastante estudada em organismos modelo, como a *Drosophila melanogaster*, porém pouco se sabe sobre essas vias em mosquitos (OVERCASH et al., 2015).

Em *D. melanogaster* ortólogos de diversas proteínas envolvidas na RDD já foram identificados e estudados. Madigan et al. demonstrou, em experimentos utilizando cultura de células e larvas de *D. melanogaster*, que a variante H2Av é fosforilada em Ser137 após tratamento com radiação gama, sendo ortólogo funcional de H2AX (MADIGAN, 2002). O gene *spindle-A* (*spn-A*) codifica o ortólogo de RAD51 assumindo papel central e crucial em HR. Fêmeas com mutações em *spn-A* são inférteis devido a defeitos no reparo de DSBs durante a oogênese, gerando ovos aberrantes (SEKELSKY, 2017; STAEVA-VIEIRA; YOO; LEHMANN, 2003). A LIG4, envolvida na NHEJ também foi identificada e estudada em *D. melanogaster*, tendo sido demonstrado que sua deleção gera moscas viáveis, porém hipersensíveis a radiação ionizante (GORSKI et al., 2003; SEKELSKY, 2017). Proteínas de MMR, BER e NER também são encontradas em *D. melanogaster*.

Além de *D. melanogaster*, estudos envolvendo genes relacionados à RDD foram realizados em outros insetos. Em embriões de *Bombyx mori*, foi demonstrado que o silenciamento de KU70 acarretou no aumento da frequência de HR (MA et al., 2014). Além disso, proteínas de RDD foram identificadas, através de um estudo evolutivo, em *Apis mellifera* e *Tribolium castaneum*, além de *D. melanogaster*. Este trabalho identificou uma gama de proteínas cruciais para a RDD nestes insetos, como: RAD51, RAD50, LIG4 e XPC (ARCAS et al., 2014).

Em *A. aegypti*, um estudo realizou o silenciamento de KU70 e LIG4 e demonstrou que, apesar da depleção de KU70 ter reduzido a frequência de NHEJ e aumentado a de SSA, o efeito foi contrário para LIG4, acarretando em aumento da atividade de NHEJ e SSA (BASU et al., 2015). O trabalho em questão foi conduzido com objetivo de aumentar a taxa de HR para melhor aplicabilidade de técnicas de edição genômica.

De fato, o crescente interesse em gerar mosquitos transgênicos que sejam incapazes de propagar doenças exige amplo conhecimento das vias de reparo de DSB. Diversos métodos de engenharia genômica já foram aplicados em *A. aegypti*, como por exemplo ZFNs (nucleases de dedo de zinco - *zinc finger nucleases*), HEs (nucleases teleguiadas - *homing endonucleases*), TALENs (nucleases com efetores do tipo ativador

transcricional - *transcription activator-like effector nucleases*) e CRISPR-Cas9 (repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas - *clustered regularly interspaced palindromic repeats*) (ARYAN et al., 2013a; ARYAN; MYLES; ADELMAN, 2014; DEGENNARO et al., 2013; KISTLER; VOSSHALL; MATTHEWS, 2015; MA et al., 2014; MCMENIMAN et al., 2014). Essas técnicas permitem a edição do genoma através da introdução de DSBs que, posteriormente, serão reparadas pelos mecanismos de reparo de DSB. Dessa forma, as vias de reparo HR e NHEJ são empregadas na manipulação genômica e, devido as suas peculiaridades, possuem consequências diferentes nesse processo. Como discutido anteriormente, a NHEJ é propensa a erros, e pode resultar na introdução de pequenas inserções ou deleções (*indels*) na região da quebra, sendo eficiente no nocaute de genes. Em contrapartida, a HR utiliza a região homóloga da cromátide irmã como molde, conferindo maior acurácia ao reparo, sendo empregada na adição de transgenes através de um modelo e na correção de genes contendo mutações (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; GILLES; AVEROF, 2014).

O estudo da RDD em *A. aegypti* pode auxiliar na implementação das técnicas de manipulação genômica, garantindo o sucesso na produção de mosquitos geneticamente modificados. Além disso o conhecimento da RDD, assim como o de sua regulação frente a diversos estímulos, é de suma importância para entender a fisiologia e as adaptações relacionadas ao meio ambiente e a hematofagia.

## 2. OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão dos genes das vias de reparo do DNA em larvas de *Aedes aegypti*, submetidas ao tratamento com paraquat.

2.1.Objetivos específicos

• Identificar proteínas relacionadas à resposta ao dano ao DNA codificadas na predição gênica versão 5.1 de *A. aegypti*.

• Analisar os dados de sequenciamento, gerar índices de expressão gênica e identificar os genes diferencialmente expressos.

• Identificar, através dos índices de expressão, vias que estejam sendo ativadas ou inibidas mediante aos estímulos de estresse oxidativo.

• Avaliar o perfil de expressão de genes relacionados à resposta ao dano previamente identificados.

• Validar alterações de expressão significativas por PCR quantitativo.

## 3. METODOLOGIA

3.1.Identificação de proteínas relacionados ao reparo do DNA em A. aegypti

A metodologia de blast recíproco (ALTENHOFF; DESSIMOZ, 2009) foi empregada para identificar e anotar, manualmente, ortólogos das proteínas de RRD na versão 5.1 da predição gênica de *A. aegypti*. Para essa análise foi criado um banco de dados, denominado *DDR database*, contendo proteínas de RRD de *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* e *Apis mellifera*. As proteínas de *H. sapiens* foram extraídas do *Reactome* (banco de dados de vias biológicas - https://reactome.org/PathwayBrowser/), das vias: *base excision repair*, *nucleotide excision repair*, *mismatch repair*, *DNA doublestrand break response*, *HDR through homologous recombination* (*HRR*) or single strand annealing e nonhomologous end-joining (*NHEJ*). As proteínas de *D. melanogaster* e *A. mellifera* foram obtidas da literatura (ARCAS et al., 2014). A figura 13 apresenta um esquema da metodologia de blast recíproco.

No primeiro blastp as proteínas do banco de dados DDR database foram utilizadas como queries e as proteínas da predição 5.1 de A. aegypti como subject. Os primeiros cinco hits com e-value menor que 10<sup>-15</sup> foram considerados na análise posterior. Os hits foram comparados, através de blastp subsequentes, com os bancos de dados informativos Gene **Ontology** (GO)lançamento 2018-08-04 proteins, (http://archive.geneontology.org/); KEGG eukaryotes (KE) proteins, lançamento 2017-06-05; Uniprot\_Sprot (US), lançamento 2018\_05 (http://ftp.ebi.ac.uk); Conserved Domain Database (CDD), versão 3.16 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov). As proteínas de A. aegypti foram consideradas ortólogas se: a) Se a anotação dos dois primeiros hits (para todos os bancos de dados) for igual a anotação do blast inicial; b) Se apresentar domínios conservados semelhantes ao query inicial.

Os alinhamentos múltiplos foram feitos no Clustal Omega *web server* (CHOJNACKI et al., 2017) e o NetPhos 3.1 *web prediction server* (BLOM et al., 2004) foi empregado para predição de sítios de fosforilação. Em ambos os softwares foram atribuídos os parâmetros padrão.



Figura 13: Esquema da metodologia de blast recíproco.

As setas "A-E" representam as análises de blastp, sendo os "*queries*" as proteínas dos bancos de dados da base da seta e os "*subjects*" as proteínas dos bancos de dados da ponta da seta. Os primeiros 5 hits, do blastp inicial (blastp A), com e-value  $< 10^{-15}$  formaram o grupo hits. Os blastp reversos (blastp B-E) foram feitos entre os hits e os bancos de dados informativos e considerados ortólogos se apresentarem e-value  $< 10^{-15}$ ; se a anotação dos 2 primeiros hits for igual a anotação do blast inicial; e se apresentar domínios conservados semelhantes ao *query* inicial.

### 3.2. Eclosão dos ovos

Os ovos de *A. aegypti* linhagem *Black Liverpool Black eye* foram cedidos pelo Professor Mário Alberto Cardoso Silva-Neto (*in memoriam*) do Laboratório de Sinalização Celular (LabSiCel), do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Os mosquitos foram criados em insetário em ciclo claro/escuro de 12h, temperatura à 28 °C, 80% de umidade relativa do ar, e mantidos em gaiolas com solução de sacarose 10%. As fêmeas foram alimentadas naturalmente em veias da orelha de coelhos, ou artificialmente com sangue de coelho heparinizado. Os cuidados com os animais e os protocolos experimentais seguiram as diretrizes do Comitê de avaliação do uso de animais em pesquisa da UFRJ, CAUAP-UFRJ e do Guia NIH para o uso e cuidado

de animais de laboratório (ISBN 0-309-05377-3). Os protocolos foram aprovados pelo CAUAP-UFRJ (registro IBQM067-05/16).

Para a eclosão, um papel de filtro contendo ovos de *A. aegypti* foi colocado no fundo de uma bandeja plástica (302 x 208 x 63mm) contendo, aproximadamente, 1 L de água mineral e 0,7 gramas de Ração Pedigree. A bandeja foi mantida em estufa BOD escura à 28 °C durante 3 dias, tempo necessário para que as larvas atinjam o estágio L3 de crescimento.

#### 3.3.Extração e dosagem de RNA

Três grupos de larvas foram tratados com 0,5 mM de paraquat (Sigma-Aldrich) por 6, 12 e 24h. O tratamento foi realizado em tubos Falcon de 15 mL contendo 1 mL de água, 0,5 mM de paraquat e 5 larvas. Após o período de tratamento as larvas foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL contendo 500  $\mu$ L de RNA*later* (Sigma-Aldrich), mantidas na geladeira durante 24h e em seguida armazenadas em RNA*later* a -20 °C até o momento da extração. As larvas do grupo controle foram adicionadas ao RNA*later*, imediatamente, após o grupo de 24h.

Para extração do RNA total foram utilizadas 15 larvas de cada grupo (controle, 6h, 12h e 24h). A extração foi realizada utilizando TRIzol (Ambion) seguindo o protocolo padrão do mesmo com pequenas alterações, conforme descrito brevemente a seguir. Primeiramente, todo RNAlater foi removido do microtubo. Em seguida as larvas foram maceradas e homogeneizadas, em 200 µL de TRIzol, com auxílio de um macerador, durante 2 minutos. Após a maceração, 800 µL de TRIzol foram adicionados ao homogenato, totalizando 1 mL de TRIzol por amostra. Subsequentemente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck) as amostras, que foram agitadas vigorosamente, em vortex, por 30 segundos e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após incubação procedeu-se a centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos à 4°C, separando o material em 3 fases: fase aquosa superior (RNA); interfase (clorofórmio, DNA e proteínas) e fase inferior orgânica (fenol). A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para microtubo de 1,5 mL e 700 µL de isopropanol (Merck) foram adicionados. Em seguida, após homogeneização e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos à 4°C, para precipitar o RNA total. Após a centrifugação o sobrenadante (isopropanol) foi descartado e o RNA foi lavado com 1 mL de etanol (Merck) 75% gelado (-20°C). Em seguida, foi feita centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos à 4°C, o sobrenadante (etanol) foi descartado e, após secar em temperatura ambiente, o RNA foi ressuspendido em 20  $\mu$ L de água livre de RNAse .

A quantificação foi feita através de espectrofometria e a integridade foi avaliada através de gel de agarose 1% (TAKAHASHI; OGINO; BABA, 1969), utilizando GelRed como corante fluorescente e padrão peso de 1 kb.

As amostras de RNA total foram armazenadas em freezer -80°C até o momento do envio para sequenciamento.

#### 3.4.Sequenciamento

O RNA total extraído foi enviado para o Centro de sequenciamento Texas A&M AgriLife Center for Bioinformatics and Genomic Systems Engineering em Austin, Texas, nos Estados Unidos. As bibliotecas foram preparadas utilizando o TruSeq Stranded Total RNA e sequenciadas em equipamento Illumina HiSeq 4000.

O preparo das bibliotecas envolveu a purificação do mRNA através do uso de oligonucleotídeos poli-T aderido a esferas magnéticas, que se ligam a cauda poli-A do mRNA. Em seguida, o mRNA purificado foi fragmentado em pequenos pedaços por intermédio de cátions divalentes sob temperatura elevada (figura 14A). A primeira fita do cDNA foi sintetizada pela transcriptase reversa e *random primers* (figura 14B) e, subsequentemente, a síntese da segunda fita foi realizada pela polimerase I e RNase H (figura 14C). A incorporação de dUTP ao invés de dTTP extingue a segunda cadeia durante a amplificação, uma vez que a polimerase I não é capaz de incorporar este nucleotídeo. Posteriormente, para evitar a ligação de fragmentos contundentes durante o processo de adição dos adaptadores, uma única adenina (A) foi adicionada às extremidades 3' do cDNA. Além disso, os adaptadores contêm a timina (T) correspondente na extremidade 3' (figura 14D e 14E), dessa forma, a adenilação também auxilia na ligação do cDNA aos adaptadores. Por fim, os produtos foram purificados e amplificados por PCR para gerar as bibliotecas de cDNA (figura 14F e 14G).

A imobilização das bibliotecas ocorreu através dos adaptadores que possuíam sequências complementares aos oligonucleotídeos presentes na lâmina de sequenciamento. A clusterização através da amplificação em ponte, gerou os *clusters*, que foram sequenciados por síntese. Este método utiliza nucleotídeos marcados, que são incorporados durante a síntese e emitem um sinal fluorescente mediante excitação a laser.

50 ciclos de síntese foram feitos para gerar *reads* com 50 pb (pares de base). Um esquema da metodologia de sequenciamento Illumina é apresentada na figura 15.



Figura 14: Esquema do preparo das bibliotecas de cDNA.

(A) Purificação e fragmentação do mRNA. (B) Síntese de primeira fita do cDNA. (C) Síntese da segunda fita do cDNA. (D) Adenilação da extremidade 3'. (E) Ligação dos adaptadores. (F) Amplificação por PCR.
(G) Biblioteca final. Adaptado de TruSeq Stranded mRNA - Reference Guide.



Figura 15: Esquema do sequenciamento Illumina. Adaptado de An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.

3.5. Análise bioinformática dos transcriptomas

As análises de transcriptômica foram conduzidas em servidor supermicro com 256 GB de memória, 6 TB de HB e sistema operacional Linux Debian 8.

# 3.5.1 Controle de qualidade e limpeza

As bibliotecas foram submetidas a uma etapa de controle de qualidade através do software FastQC versão 0.11.5 (ANDREWS, 2010), utilizando os parâmetros padrão do programa, e uma lista de possíveis contaminantes Illumina para verificar a presença de adaptadores. O programa FastQC avalia diversos parâmetros de qualidade, como por

exemplo o número total e tamanho dos *reads*, %CG, qualidade dos *reads* por base, *reads* duplicados e super-representados.

Em seguida, a etapa de limpeza, importante para remoção de *reads* de baixa qualidade e adaptadores, foi realizada através do programa Cutadapt versão 1.16 (MARTIN, 2011), utilizando como parâmetros *overlap* de 1 e erro de até 20%. Os *read* com qualidade (*Phred score*) inferior a 35 e tamanho menor que 40 pb também foram removidos. O FastQC (ANDREWS, 2010) foi novamente utilizado para avaliar a qualidade após a limpeza com Cutadapt (MARTIN, 2011).

## 3.5.2. Mapeamento dos reads

O programa Bowtie2 versão 2.2.6 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), foi utilizado para mapear os *reads* contra as regiões codificantes dos genes preditos (CDS), versão 5.1, obtida no VectorBase (https://www.vectorbase.org/). Primeiramente, foram criados os índices para as CDS utilizando o comando *bowtie2-build*. Em seguida, para o mapeamento, foi empregado o modo de alinhamento *end-to-end*, o qual busca por alinhamentos envolvendo todos os nucleotídeos. Para o cálculo do *score-min* foi utilizada a função linear:  $f(x) = -2 + -0.3 \times x$ , onde x corresponde ao tamanho do *read*, permitindo um erro de até 5%. Os *reads* que não alinharam foram mapeados contra o genoma *soft-mask*<sup>1</sup> obtido através do VectorBase.

## 3.5.3. Quantificação dos reads

O alinhamento, obtido através do Bowtie2, foi empregado na quantificação dos *reads* realizada pelo Salmon, versão 0.9.1 (PATRO et al., 2017), utilizando o método *Quantifying in alignment-based mode*. O Salmon estima o número de *reads* que mapearam em cada transcrito, considerando *reads* que alinharam apenas em um transcrito e *reads* que mapearam em mais de um transcrito. Além disso, o Salmon também normaliza os *reads* em transcritos por milhão (TPM). A contagem de *reads* gerada pelo Salmon foi utilizada para realizar as análises de expressão diferencial, e o TPM para as análises de perfis de expressão.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Regiões repetitivas e de baixa complexidade são mascaradas utilizando letras minúsculas.

### 3.5.4. Análise de expressão diferencial

A análise de expressão diferencial foi feita utilizando o pacote do R (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING., 2018) chamado DESeq2, que implementa uma distribuição binominal negativa como base para as análises (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Duas tabelas foram usadas como *input* para o DESeq2, a primeira contendo a quantificação dos *reads* não normalizada, obtida pelo Salmon, e a segunda incluindo o número total de *reads* de cada uma das bibliotecas. Para verificar os genes diferencialmente expressos foi aplicado o teste *likelihood ratio test* (LRT), o qual é indicado para análise temporal. Somente genes com *p-value* menor que 0,05 foram considerados como diferencialmente expressos.

#### 3.5.5. Análise de perfis de expressão

O programa Expander versão 7.1 (SHARAN; MARON-KATZ; SHAMIR, 2003) foi utilizado para analisar padrões de expressão gênica nos diferentes transcriptomas. Para os genes diferencialmente expressos (obtidos através da análise com DESeq2) foi empregado o algoritmo *CLICK*. Esse algoritmo implementa a teoria de grafos e técnicas estatísticas para identificar grupos de elementos altamente similares (chamados de *kernels*), que possivelmente pertencem a um mesmo *cluster*, agrupando assim genes com perfis de expressão semelhantes em um mesmo *cluster* (SHARAN; MARON-KATZ; SHAMIR, 2003). Para obter os perfis de expressão dos genes de RDD também foi utilizado o algoritmo *hierarchical clustering*, o qual calcula um dendograma para os perfis de expressão. Neste algoritmo, para um número n de genes, uma matriz de similaridade diagonal superior é calculada, contendo pontuações de similaridade para todos os pares de genes (EISEN et al., 1998).

O Expander utilizou como input uma tabela contendo as médias de TPM (obtido pelo Salmon).

### **3.5.6.** Enriquecimento funcional

O software Panther (MI et al., 2019) foi empregado nas análises de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos. A primeira etapa dessa

metodologia consistiu em identificar a família ou subfamília PANTHER (PANTHER HMM ID), de cada gene para gerar o PANTHER generic mapping. Dessa forma, software PANTHER Scoring Tool versão 2.1 foi utilizado para mapear os genes contra o banco de dados Panther HMM library versão 13.0, através do método HMMSEARCH. O Panther generic mapping foi gerado para dois arquivos fasta: um contendo apenas os genes diferencialmente expressos e outro incluindo todos os genes de A. aegypti com exceção dos diferencialmente expressos. Em seguida o PantherDB (http://www.pantherdb.org) foi utilizado para classificar os genes nas categorias: vias, função molecular, processo biológico, componente celular e classe proteica. Nessa etapa o software online gerou uma tabela (para cada categoria) contendo o número de genes atribuídos para cada classificação. Para realizar a análise estatística as tabelas foram baixadas e o R foi utilizado para calcular o *p-value* do teste de Fisher (*p.Fisher*). Para o cálculo do false discovery rate - FDR (10% de erro), os valores de p.Fisher foram ordenados em ordem crescente obtendo sua posição na tabela (Px), dessa forma o FDR foi calculado pela fórmula:  $\frac{Px}{r} \times 0,1$ , onde x corresponde ao número de classificações e Px a posição de cada classificação na tabela. As classificações que apresentaram p.Fisher maior que FDR10% foram classificadas com enriquecidas.

### 3.6.PCR quantitativo

Genes diferencialmente expressos no transcriptoma foram escolhidos para serem validados por PCR quantitativo (qPCR). A ferramenta online Primer3 versão 0.4.0 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) foi utilizada para desenhar os iniciadores, restringindo o tamanho do produto em 150-200 pb. Além disso, para evitar a amplificação de possíveis contaminantes de DNA genômico, os iniciadores foram desenhados para anelar no cDNA na junção de éxons. A tabela 1 mostra a sequência dos iniciadores utilizados. Todos os primers foram testados eletronicamente, com erro de 10%, utilizando o programa primersearch versão EMBOSS:6.6.0.0. (http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/primersearch.html).

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o reagente HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biodyne), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, reações com volume final de 10  $\mu$ L foram feitas utilizando 2  $\mu$ L do reagente, 4 picomols de cada um dos primers (tabela 1) e 2  $\mu$ L de cDNA diluído a 1:100.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no PCR quantitativo.

Gene	Iniciador	Tamanho
XRCC1 AAEL002782-RB	Senso: GAAAACCGCCGACTTACAAA	- 174
	Anti-senso: TCTTGAAGGCGCATATGAGAT	
PARP1 AAEL011815-RA	Senso: CTACGTTCCGAATTGGGCTA	- 155
	Anti-senso: TCATCCTTTGGTTCGGACTT	
RFC1 AAEL001324-RB	Senso: TGTGCTCAGGTCATCAAGGA	
	001324-RB Anti-senso: ACTGCCCTTCTTGGGAAGTC	
XPB AAEL013205-RA	EL013205-RA Anti-senso: CGGGACCGTTGTCTTACTCA	
L018259-RB Anti-senso: CAGTGCTTTCTCTAGCCATGC		
TOPBP1 AAEL013962-RB	BP1 Senso: CAAATGGGACCTCACCGTAG	
	EL013962-RB Anti-senso: CGACTTGTGCTGATTGAAGC	
RAD9 AAEL010759-RA	D9 EL010759-RA Anti-senso: GGTAGTTCGCTTCGTCTTGG	
L003396 Anti-senso: AGCTGGAGGTGCTGATGA		

As reações foram conduzidas em termociclador LineGene 9600 (Bioer) seguindo o esquema mostrado na tabela 2. As etapas 2 a 4 foram repetidas por 50 ciclos, seguidas por curva de desnaturação.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	95	15
2	95	00:15
3	60	00:20
4	72	00:20

Tabela 2: Esquema da reação utilizada no PCR quantitativo.

A validação das reações foi feita utilizando a inclinação e o valor de  $R^2$  de curvas de amplificação com diferentes quantidades de cDNA. Os pontos da curva foram preparados através de diluição seriada de fator 5.

Os níveis de transcrição de cada gene foram analisados através da diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno (Rp49) de uma mesma amostra, medido através do *threshold cycle* (Ct). A expressão relativa entre o grupo de larvas tratadas com paraquat por 6h, 12h e 24 h e o grupo controle foi analisada através da diferença dos valores de Ct de cada amostra tratada contra a média de Ct do grupo controle através da fórmula: 2<sup>-Ct</sup> (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## 4. RESULTADOS

### 4.1.Extração e dosagem de RNA

Para extração de RNA, as larvas de *A.aegypti* foram tratadas com 0,5 mM de paraquat durante 6h, 12h e 24h, e posteriormente mantidas em RNA*later* até o momento da extração com TRIzol. O controle não tratado foi adicionado ao RNA*later* logo após a amostra de 24h. As extrações foram realizadas em triplicata, obtendo 12 amostras de RNA (controle, 6h, 12h e 24h), todas com razão 260/280 superior a 1,8 (tabela 3). A qualidade foi aferida através de gel de agarose 1% (figura 16). A banda do RNA ribossomal 28S não foi detectada, condizente com o fenômeno *hidden break*, no qual a subunidade 28S se degrada e migra próximo a banda da fração 18S. A literatura já reportou a ocorrência desse fenômeno na maioria dos insetos, incluindo *A. aegypti* (MACHARIA; OMBURA; AROKO, 2015).

As amostras de RNA total foram utilizadas para o preparo de bibliotecas de cDNA, as quais foram sequenciadas em equipamento Illumina HiSeq 4000.

Amostra	Quantificação (µg/µL)	260/280
CTRL-01_11	0,86	1,86
CTRL-04_11	1,10	1,92
CTRL-08_12	0,84	1,84
6h-01_11	1,67	1,86
6h-04_11	1,10	1,89
6h-08_12	2,90	1,85
12h-01_11	2,00	1,84
12h-04_11	1,22	1,80
12h-08_12	1,5	1,85
24h-01_11	1,16	1,82
24h-04_11	0,56	1,94
24h-08_12	0,85	1,85

Tabela 3: Quantificação e razão 260/280 das amostras de RNA.



Figura 16: Gel de agarose 1% utilizando corante gelred. A figura mostra apenas o gel para um lote de amostras (controle, 6h, 12h e 12h). Padrão de peso de 1kb.

## 4.2.2. Controle de qualidade e limpeza

Após o sequenciamento em plataforma Illumina Hiseq 4000, foram geradas 12 bibliotecas (triplicata de 4 condições), *single-end*, contendo *reads* com 50 pb. A limpeza com Cutadapt objetivou a remoção de possíveis sequências de adaptadores e *reads* com valor *phred* inferior a 35. O gráfico apresentado na figura 17 relaciona os *reads* limpos com o número de *reads* removidos, mostrando que a remoção dos *reads* foi proporcional ao tamanho da biblioteca ( $R^2 = 0,9942$ ). Após a limpeza, todas a bibliotecas apresentaram boa qualidade. O total de *reads* de cada biblioteca, o número e a porcentagem de *reads* removidos na etapa de limpeza, e o total de *reads* restantes estão apresentados na tabela 4.

Biblioteca	Total de reads	Total de r <i>eads</i> removidos	Total de reads restantes
CTRL-01_11	24930232	604728 (2,4%)	24325504 (97,6%)
CTRL-04_11	43265769	1007818 (2,3%)	42257951 (97,7%)
CTRL-08_12	30113270	744427 (2,5%)	29368843 (97,5%)
6h-01_11	36591930	883065 (2,4%)	35708865
6h-04_11	36191728	858536 (2,4%)	35333192 (97,6%)
6h-08_12	39839867	986030 (2,5%)	38853837
12h-01_11	7482587	171603 (2,3%)	7310984 (97,7%)
12h-04_11	21619650	488654 (2,3%)	21130996 (97,7%)
12h-08_12	32427239	796023 (2,5%)	31631216 (97,5%)
24h-01_11	61193708	1424888 (2,5%)	59768820 (97,7%)
24h-04_11	35586858	824489 (2,3%)	34762369 (97,7%)
24h-08_12	33043420	780126 (2,4%)	32263294 (97,6%)

Tabela 4: Resumo do resultado do Cutadapt.



Figura 17: Gráfico relacionando o número de *reads* removidos com o volume de dados limpos.  $R^2 = 0,9942$ .

## 4.2.3. Mapeamento e quantificação dos reads

O programa Bowtie2 foi utilizado para mapear os *reads* contra as sequências codificantes de proteínas (do inglês *coding sequences* - CDS) versão 5.1, obtidas no banco de dados VectorBase. Aproximadamente 63% dos *reads* foram alinhados contra as CDS (tabela 5). O Bowtie2 foi utilizado novamente para tentar mapear os *reads* ainda não alinhados, agora utilizando a sequência do genoma *soft-masked*. A porcentagem de *reads* que alinharam contra o genoma, mas não com os CDS, foi de aproximadamente 11%, estes não foram utilizados nas análises, mas este resultado sugere que existam genes ainda não identificados neste genoma.

A quantificação dos *reads* foi feita com o programa Salmon, que lê o arquivo BAM do alinhamento, e como resultado, gera uma tabela contendo as contagens de *reads* e de transcritos por milhão (TPM) para cada CDS.

Biblioteca	Porcentagem dos <i>reads</i> alinhados nas CDS	Porcentagem de <i>reads</i> que não alinharam nas CDS mas alinharam no genoma
CTRL-01_11_S9_L008_R1_001	64.04%	10,53%
CTRL-04_11_S13_L008_R1_001	63.64%	11,26%
CTRL-08_12_S17_L008_R1_001	63.86%	11,43%
6h-01_11_S10_L008_R1_001	64.15%	11,75%
6h-04_11_S14_L008_R1_001	63.68%	11,13%
6h-08_12_S18_L008_R1_001	63.93%	12,06%
12h-01_11_S11_L008_R1_001	63.67%	11,71%
12h-04_11_S15_L008_R1_001	63.28%	12,53%
12h-08_12_S19_L008_R1_001	64.71%	12,36%
24h-01_11_S12_L008_R1_001	63.26%	11,41%
24h-04_11_S16_L008_R1_001	63.57%	11,71%
24h-08_12_S20_L008_R1_001	63.45%	11,94%

Tabela 5: Resultado do alinhamento com Bowtie2.

## 4.2.4. Genes diferencialmente expressos

O pacote do R DESeq2 foi empregado para encontrar os genes diferencialmente expressos ao longo da curva temporal. Através do teste estatístico "LRT" foram encontrados 1848 genes diferencialmente expressos (p-value < 0,05). Os índices de expressão (TPM) para estes genes, em toda a curva temporal, foram utilizados para realizar um agrupamento não supervisionado pelo algoritmo *click* do programa Expander, revelando 5 perfis de expressão (figura 18). O grupo 1 corresponde a genes que aumentaram a expressão mediante ao tratamento com paraquat; o grupo 2 inclui genes que diminuíram a expressão em função do tratamento; o grupo 3 possui genes que apresentaram expressão transiente, ou que não tinham diferença de expressão entre os tempos 6h e 12h; o grupo 4 apresenta genes com expressão pronunciada em 6h; o grupo 5 agrupou genes com expressão pronunciada em 12h.



Figura 18: Blocos de perfis de expressão dos 1848 genes diferencialmente expressos. (A) Grupo 1: genes que aumentaram a expressão em função do tratamento com paraquat; (B) Grupo 2: genes que reduziram a expressão mediante ao tratamento com paraquat; (c) Bloco 3: genes com expressão pronunciada em 12h. (d) Bloco 4: genes com expressão pronunciada em 24h. (e) Bloco 5: genes com diminuição transiente. (f) Bloco 6: genes com diminuição.

## 4.2.5. Enriquecimento funcional

O enriquecimento funcional foi feito para os genes diferencialmente expressos dos maiores grupos, sendo o grupo 1 com 809 genes e o 2 com 798 genes. O Panther foi empregado nas análises, classificando os genes em 5 categorias: vias (figura 18), função molecular (figura 19), processo biológico (figura 20), componente celular (figura 21) e classe proteica (figura 22).

No grupo 1, que apresenta genes com expressão aumentada nas larvas tratadas com paraquat, encontram-se enriquecidos genes relacionados a transcrição do DNA, síntese de proteínas, autofagia da mitocôndria, resposta ao estresse, reparo de DSB e aos transportadores ABC.

Em relação aos transportadores ABC, na categoria *ATP-binding cassette (ABC) transporter* (PC00003) foram encontrados 10 genes, incluindo 2 genes relacionados ao efluxo de drogas: *Multidrug resistance-associated protein 9* (ABCC12 - AAEL005043-PA) e *Multidrug resistance-associated protein 1* (ABCC1 - AAEL004743-PO, AAEL019847-PA). O aumento de expressão destes genes indica um possível mecanismo de detoxificação, em uma tentativa da célula em remover o paraquat e evitar danos.

Foram encontrados 23 genes diferencialmente expressos na categoria enriquecida *cellular response to stress* (GO:0033554) e 6 genes em *double-strand break repair* (GO:0006302). Nestas categorias estão inclusos genes de suma importância na RDD como PARP1 (AAEL011815-PA), XPC (AAEL018259-PB), POLE2 (AAEL002785-PA), KU80 (AAEL003684-PA), RAD9 (AAEL010759-PA), APLF (AAEL011254-PA/B), LIG4 (AAEL021495-PA) e RPA1 (AAEL012826-PA). Além de outros fatores como *histone parylation factor 1* (HPF1 - AAEL001300-PA), Ferritin (AAEL007383-PE-G) e a chaperona DNAJ (AAEL003366-PA). Os resultados sugerem que a célula, enquanto tenta remover o paraquat de seu interior através dos transportadores ABC, ativa mecanismos de resposta ao estresse e aos danos no DNA, de forma a evitar e eliminar as lesões causadas por este herbicida.

O enriquecimento funcional também evidenciou o aumento de expressão de genes relacionados a transcrição do DNA e síntese de proteínas, indicando modificações transcricionais em resposta ao paraquat. Além disso, genes envolvidos na autofagia da mitocôndria, denominada mitofagia, também foram encontrados diferencialmente expressos, evidenciando uma tentativa em manter a homeostase através da eliminação de mitocôndrias danificadas.

No grupo 2, que contém genes com expressão reduzida nas larvas tratadas, estão enriquecidos os genes envolvidos com a respiração celular, fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons, síntese de ATP, ciclo do ácido cítrico, catabolismo de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos, carboidratos e pirimidinas.

Dos 108 genes encontrados no KEGG, que participam da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa em *A. aegypti*, 55 foram encontrados diferencialmente expressos (figura 24). Além disso, na figura 25 é possível observar que a maioria dos genes sofreram redução da expressão nas larvas tratadas com paraquat durante 24h. A supressão destes mecanismos, consequentemente, leva a diminuição da síntese de ATP e do metabolismo energético. Dessa forma, em conjunto com o observado no resultado do enriquecimento do grupo 1 acredita-se que o estresse oxidativo, gerado pelo paraquat, acarreta a repressão de vias catabólicas que alimentariam a respiração celular, assim como dela mesma; associada ao estímulo de mecanismos e vias de defesa ao estresse gerado, como a mitofagia, transportadores ABC, a resposta ao estresse e reparo de DSB.

Curiosamente, a categoria *response to oxidative stress* (GO:0006979), presente na classificação de processo biológico, foi encontrada enriquecida no grupo que teve diminuição de expressão (grupo 2). Entre os genes diferencialmente expressos neste grupo estão: *superoxide dismutase [Mn], mitochondrial* (Mn-SOD2 - AAEL025388-PA) e catalase (CAT - AAEL013407-PB). Como o paraquat é um herbicida capaz de gerar EROS, acreditava-se que ocorresse um aumento na transcrição de genes codificantes de

enzimas antioxidantes. Para um olhar mais aprofundado sobre essa função, o software Expander foi utilizado para gerar o perfil de expressão dos genes antioxidantes encontrados em *A. aegypti* (figura 26).

As enzimas antioxidantes glutationa-S-transferase (GST) e glutationa peroxidase (GPX) foram agrupadas em um único *heatmap* (figura 26A). A expressão de algumas GST e GPX reduziu em função do tratamento com paraquat, incluindo as variantes diferencialmente expressas (grupo 2): GSTT4 (AAEL004229-RA), GSTE3 (AAEL007947-RA), GSTT1 (AAEL009017-RA) e GSTT3 (AAEL025929-RA). Entretanto, outras variantes apresentaram aumento de expressão em resposta ao tratamento com o paraquat, incluindo GSTT2 (AAEL009016-RB), diferencialmente expressa no grupo 1.

Como observado anteriormente, a expressão do gene que codifica a enzima antioxidante, catalase (AAEL013407-RB), reduziu em resposta ao tratamento com paraquat. No entanto, a transcrição da isoforma AAEL013407-RA aumentou nas amostras tratadas com paraquat, durante 12h e 24h, indicando uma alteração na maturação do RNAm, que com um padrão de *splicing* diferente levou a produção de outra isoforma (figura 26B).

A MnSOD2 (AAEL025388-RA) teve sua expressão reduzida, com suporte estatístico, em função do tratamento com paraquat, tendo sido observado um aumento nas amostras tratadas por 6h seguido de uma drástica diminuição em 24h. O mesmo perfil de expressão foi encontrado para CuSOD3 (AAEL019937-RA), enquanto a transcrição de CuSOD1 (AAEL019759-RA), CuSOD2 (AAEL006271-RD) e CuSOD4 (AAEL019938-RA) aumentou em 12h e 24h de tratamento (figura 26C).

Em relação ao sistema antioxidante tioredoxina, formado por tioredoxina (TRX) e pelas enzimas tioredoxina peroxidase (TPX) e redutase (TRXR), a maioria dos genes aumentaram a expressão nas larvas tratadas com paraquat, principalmente nas amostras tratadas por 12h e 24h (figura 26D). Além disso, dois genes foram encontrados diferencialmente expressos no grupo 1, *thioredoxin-like* (TRXL - AAEL008291-RA) e thioredoxin peroxidase (TPX4 - AAEL002309-RA).





Figura 19: Enriquecimento funcional - função molecular.

catalytic activity, acting on RNA (GO:0140098)

nucleotidyltransferase activity (GO:0016779)

identical protein binding (GO:0042802)

ubiquitin-like protein conjugating enzyme activity (GO:0061650)

O gráfico em azul mostra o enriquecimento funcional na classificação função molecular para os genes do grupo 1 (aumento de expressão), enquanto o gráfico amarelo contém o enriquecimento para os genes do grupo 2 (diminuição de expressão). A listagem com o valor de pvalue e FDR encontra-se no anexo 1 e anexo 6 para os grupos 1 e 2, respectivamente.

Grupo 1



Figura 20: Enriquecimento funcional - processos biológicos.

O gráfico em azul mostra o enriquecimento funcional, na classificação processos biológicos, para os genes do grupo 1 (aumento de expressão), enquanto o gráfico amarelo contém o enriquecimento para os genes do grupo 2 (diminuição de expressão). Foram encontrados enriquecidos 322 genes não classificados no grupo 2. A listagem com o valor de *pvalue* e FDR encontra-se no anexo 2 e anexo 7 para os grupos 1 e 2, respectivamente.



Figura 21: Enriquecimento funcional - componente celular.

O gráfico em azul mostra o enriquecimento funcional, na classificação componente celular, para os genes do grupo 1 (aumento de expressão), enquanto o gráfico amarelo contém o enriquecimento para os genes do grupo 2 (diminuição de expressão). Foram encontrados enriquecidos 352 genes não classificados no grupo 2. A listagem com o valor de *pvalue* e FDR encontra-se no anexo 3 e anexo 8 para os grupos 1 e 2, respectivamente.



Figura 22: Enriquecimento funcional - classe proteica.

O gráfico em azul mostra o enriquecimento funcional, na classificação classe proteica, para os genes do grupo 1 (aumento de expressão), enquanto o gráfico amarelo contém o enriquecimento para os genes do grupo 2 (diminuição de expressão). A listagem com o valor de *pvalue* e FDR encontra-se no anexo 4 e anexo 9 para os grupos 1 e 2, respectivamente.





O gráfico mostra o enriquecimento funcional na classificação função molecular para os genes do grupo 2 (diminuição de expressão). No grupo 1 apenas genes não classificados (600) não classificados estavam enriquecidos. A listagem com o valor de *pvalue* e FDR encontra-se no anexo 5.



Figura 24: Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.

Os genes em branco não estão presentes em *A. aegypti*. Os genes em verde (108) e vermelho (55) estão identificados neste inseto, sendo os vermelhos diferencialmente expressos no grupo 2 (figura 18). Figura obtida através da ferramenta KEGG MAPPER.





(A) *Heatmap*. (B) Gráfico de perfil de expressão.



Figura 26: Perfil de expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante em *A. aegypti*. (A) *Heatmap* de glutationa-S-transferase (GST) e glutationa peroxidase (GPX). (B) *Heatmap* de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). (C) *Heatmap* de tioredoxina (TRX), tioredoxina peroxidase (TPX) e tioredoxina redutase (TRXR).

4.3. Estudo das vias de reparo em A. aegypti

As proteínas relacionadas a RDD foram identificadas em *A. aegypti*, através da metodologia de blast recíproco e comparadas com *D. melanogaster* e *Homo sapiens*. Em seguida, o algoritmo *Hierarchical clustering* do Expander foi empregado para gerar os perfis de expressão das vias de sinalização de ATR de DSB, recombinação homóloga (HR), junção não homóloga de pontas (NHEJ), reparo por erro de pareamento (MMR), reparo por excisão de base (BER) e de nucleotídeo (NER).

4.3.1.1. Identificação de proteínas relacionados a sinalização de ATR em A. *aegypti* 

Na via de sinalização de ATR, inicialmente, o complexo RPA, formado por RPA1, RPA2 e RPA3, se liga à ssDNA e interage com ATRIP, recrutando ATR. As três subunidades de RPA (RPA1: AAEL001324-PB; RPA2: AAEL020929-PA; RPA3: AAEL007581-PA, AAEL024947-PA), ATR (AAEL010069-PB, AAEL024373-PA) e ATRIP (AAEL002238-PA), foram encontradas em A. aegypti (figura 27). Em seguida o complexo RAD17/RFC, constituído por RAD17, RFC2, RFC3, RFC4 e RFC5, é responsável por posicionar o complexo 9-1-1 (composto por RAD9, RAD1 e HUS1) na junção ds/ssDNA. A subunidade RAD9 se liga a TOPBP1, recrutando-a para o local do dano, a qual interage com ATRIP e ATR, promovendo a ativação completa de ATR e a quinase CHK1. Ortólogos das proteínas do complexo RAD17/RFC (RAD17: AAEL027380-PA; RFC2: AAEL020929-PA; RFC3: AAEL007581-PA, AAEL024947-PA); RFC4: AAEL006788-PA e RFC5: AAEL009465-PA), do complexo 9-1-1 (RAD9: AAEL010759-PA; RAD1: AAEL025383-P/B, AAEL009701-PB-D), de TOPBP1 (AAEL013962-PB) e de CHK1 (AAEL018254-PA/B), foram encontrados em A. aegypti (figura 28). A presença de ortólogos de todas as proteínas dessa via em A. aegypti, bem como em D. melanogaster (figura 27B), evidencia a conservação da via de sinalização de ATR.



Figura 27: Sinalização de ATR - estresse de replicação em A. aegypti.

(A) Esquema da via de sinalização de ATR. Os retângulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. Os retângulos que apresentam contorno pontilhado correspondem a complexos, quando verdes significa que todos os genes do complexo estão presentes e quando azuis apenas alguns genes do complexo foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas de envolvidas na sinalização de ATR em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. A lista completa das proteínas da sinalização de ATR se encontra no anexo 10.

4.3.1.2. Análise de perfil de expressão da via de sinalização de ATR

O algoritmo *Hierarchical clustering*, do programa Expander, foi utilizado para gerar o perfil de expressão dos genes da via de sinalização de ATR (figura 28). No *heatmap* (figura 28A) é possível observar que, com exceção de TOPBP1 e CHK1, o tratamento com paraquat aumentou a expressão dos genes da cascata de sinalização de ATR. Além disso, através do gráfico da figura 28B, que mostra o perfil global de expressão de todos os genes da via, observa-se uma maior expressão dos genes nas amostras tratadas com paraquat. Três genes desta via foram encontrados diferencialmente expressos: TOPBP1 (AAEL013962-RB) no grupo 2; RAD9 (AAEL010759-RA) e RPA1 (AAEL012826-RA), ambas no grupo 1. Através dos resultados obtidos pode-se sugerir que o tratamento com paraquat causa danos que ativam a cascata de sinalização de ATR.



Figura 28: Perfil de expressão dos genes da cascata de sinalização de ATR em *A. aegypti*. (A) *Heatmap* de perfil de expressão dos genes de ATR. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes da via de sinalização de ATR.

## 4.3.2. Sinalização de DSB

4.3.2.1. Identificação de proteínas relacionados a sinalização de DSB em A. *aegypti* 

Diversas proteínas participam da cascata de sinalização de DSB, sendo ATM a principal quinase transdutora desse processo, fosforilando CHK2, p53 e H2AX. Outras proteínas importantes são: o complexo MRN, composto por RAD50, MRE11 e NBN, envolvido na detecção de DSBs; MDC1, encarregada de recrutar RNF8 e RFN168; o complexo BRCA1-A, constituído por BRCA1, BARD1, RAP80, ABRAXAS, BRCC3, BRE, BABAM1, responsável por estimular a ressecção dos terminais, junto com CtIP, promovendo HR; TP53BP1, RIF1 e PAXIP1, que se associam para inibir a ressecção favorecendo NHEJ.

Em *A. aegypti* foi possível identificar as proteínas envolvidas na etapa inicial da cascata de sinalização, tendo sido encontrados os componentes que formam o complexo MRN (NBN: AAEL023570-PA, AAEL014377-PA/B; MRE11: AAEL023601-PA; RAD50: AAEL011772-PA, AAEL005245-PB, AAEL026871-PA, AAEL020323-PA, AAEL021668-PA, AAEL025895-PA), ATM (AAEL014900-PB/C), CHK2 (AAEL007544-PA-C) e p53 (AAEL023585-PA-C).

Nas análises realizadas neste trabalho foram encontradas, em *A. aegypti*, 94 histonas H2A. Para identificar o ortólogo funcional de H2AX, foi feito um alinhamento, no Clustal Omega *web server*, entre H2AX humana, H2Av de *D. melanogaster* (ortólogo funcional nessa espécie) e as H2A encontradas em *A. aegypti*. Através do alinhamento foi possível identificar apenas uma sequência (AAEL012499-PA) que apresentava o motivo SQ na região C-terminal (local de fosforilação). A serina 134 (Ser134) de AAEL012499-PA alinhou corretamente com as serinas fosforiladas da H2AX humana (Ser139) e da H2Av de *D. melanogaster* (Ser138) (figura 30). Para reforçar a indicação da Ser134 como sítio de fosforilação e AAEL012499-PA como ortólogo funcional de H2AX foi feita uma análise de predição de fosforilação, utilizando o NetPhos 3.1 *web prediction server*. A análise confirmou Ser134 como substrato de ATM, indicando também Ser140 de H2AX humana e Ser138 de H2Av de *D. melanogaster* como sítios de fosforilação de ATM (figura 30).

Ortólogo da proteína MDC1 (AAEL012508-PB), responsável por amplificar o sinal e recrutar RNF8 e RNF168, foi identificado em *A. aegypti*. Entretanto, este mosquito possui apenas ortólogo de RNF168 (AAEL001357-PA), não tendo sido possível encontrar ortólogo para RNF8 (figura 29).

Em relação às SUMO E3 ligase PIAS4 e PIAS1, envolvidas na sumoilação de diversas proteínas que participam do reparo de DSB, apenas PIAS1 possui ortólogo em *A. aegypti* (AAEL015099-PE/F) (figura 29).

As proteínas do complexo BRCA1 e CtIP, responsáveis por induzir a ressecção dos terminais de DSB promovendo HR, não foram identificadas em *A. aegypti* e, curiosamente, também estão ausentes em *D. melanogaster*. Ademais, TP53BP1, envolvida com a inibição da ressecção e indução de NHEJ, não foi identificada em *A. aegypti*. Entretanto, ortólogos de PAXIP1 (AAEL025635-PA) e RIF1 (AAEL021836-PA-C) foram encontrados neste inseto (figura 29). Como é possível observar no *heatmap* da figura 30B, *D. melanogaster* também não possui ortólogos para as proteínas do complexo BRCA1-A e para TP53BP1. A ausência destas proteínas aponta diferenças na via de sinalização de DSB entre estes insetos e humanos.




(A) Esquema da via de sinalização de DSB. Os retângulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. Os retângulos que apresentam contorno pontilhado correspondem a complexos, quando verdes significa que todos os genes do complexo estão presentes e quando azuis apenas alguns genes do complexo foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas de sinalização de DSB em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. A lista completa das proteínas de sinalização de DSB em *A. aegypti* se encontra no anexo 11.

-
 <b>n</b>
••
-

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	10
				.	.				.	1
H2AX_Hsa				MSGRG	KTGGKARAKA	KSRSSRAGL(	FPVGRVHRLI	RKG-HYAER	VGAGAPVYL	AAVL
H2Av Dme				MAGGKAG	KDSGKAKAKA	VSRSARAGL(	FPVGRIHRH	KSRTTSHGR	VGATAAVYS	AAIL
012499A				MSQKG		QTKSSRAGE	FPVGRITTAL	KRG-KYAER		AATL
000518B		MYKITLVLAIN	PHQYSLPYAFV	NVSLIAVPGR-			YPPS	QEGQLERAR	LVLALQS TW	LPSW
003669A				MSGRG	K-GGKVRAKA	KTRSSRAGL	FPVGRTHRLI	RKG-NYAER		AAVM
003687в				MSSRG	K-GR KVG TKA	KSRSGRAGL	FPVGRIHRLI	RKG-NYAER		AAVM
020601A				MSGRG	K-GGKVKGKA	KSRSNRAGL(	FPVGRIHRLI	RKG-NYAER		AAVM
020927A				MSGRG	K-GGKVKGKA	KSRSNRAGL(	FPVGRIHRLI	RKG-NYAER		AAVI
022161A	MSAAQGYACIKDTL	IREITISTAY	REVNVCESSE	LKLNHKMSGRG	K-GGKVKGKA	KSRSNRAGL(	FPVGRIHRLI	RKG-NYAER		AAVM
023269A				MSGRG	K-GGKVKGKA	KSRSNPRWI	VPSRSYSPS/	PEG-QLCER		AAVM
023343A				MSGRG	K-GGKVKGKA	KSRSNRAGL	FPVGRIHRLI	RKG-NYAER		ITER
023603A				MAGGKAG	KDSGKAKAKA	VSRSARAGL	FPVGRIHRH	KNRTTSHGR	VGATAAVYS	AAIL
025828A		MVSAVE	PPLRFVCYFIH	FVRTIL YR	L-RTLRERKG	KSRSNRAGL	FPVGRIHRLI	RKG-NYAER		AAVM
026250A				MSGRG	K-GGKVKGKA	KSRSNRAGL(	FPVGRIHRLI	RKG-KLCER		AAVM
026947A				MSGRG	K-GGKVK GKG	KVPFQPRWL	VESPVVFTR	PPEGPTMPS	VSVAGGSSHTW	CPYG
	110	120	130 14	0 150	160	170	180	190		
		1		.	.					
H2AX_Hsa	EYLTAEILELAGNA	ARDNKKTRIII	PRHLQLAIRND	EELNKLLGGVT	IAQG-GVLPN	I I QAVLL PKK	SATVGPKAP:	GGKKATQAS	ЕУ	
H2AX_Hsa H2Av_Dme	EYLTAE IL ELAGNA EYLTAEVL ELAGNA	ARDNKKTRII SKDLKVKRITI	PRHLQLAIRND PRHLQLAIR <mark>G</mark> D	EELNKLLGGVT EELDSLIK-AT	IAQG-GVLPN IAGG-GVIPH	I I QA VLL PKK I I HKSLIGKKI	SATVGPKAPS ETVQDPQRK-	GGKKATQAS	ЕУ АУ	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A	EYLTA EIL ELAGNA EYLTA EVL ELAGNA EYLLA EVL ELSGNA	ARDNKKTRII SKDLKVKRIT AKDNKKSRIV	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHIQLAVRND	EELNKLLGGVT EELDSLIK-AT DELSKLLSHVS	IAQG-GVLPN IAGG-GVIPH ISQG-GVLPS	I I QA VLL PKK: I I HKSL I GKKI I HSALL PKS	SATVGPKAP: ETVQDPQRK- LIKKASAAG-	GGKKATQAS GNVILS -GDSNPS	ЕУ АУ ЕУ	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B	EYLTÄ EILELAGNA EYLTÄ EVLELAGNA EYLLÄ EVLELSGNA NIMLLKFWNWRGNA	ARDNKKTRII SKDLKVKRIT AKDNKKSRIV ARDNKKTRII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHIQLAVRND PRHLQLAIRND	EELNKLLGGVT EELDSLIK-AT DELSKLLSHVS EELNKLLSGGY	IAQG-GVLPN IAGG-GVIPP ISQG-GVLPS HCTGVVVLPN	I IQAVLL PKK I IHKSL I GKK I IHSALL PKS I IQAVLL PKK	SATVGPKAPS ETVQDPQRK- LIKKASAAG- EKKA	GGKKATQAS GNVILS -GDSNPS	ЕУ АУ ЕУ	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A	EYLTA EIL ELA GNA EYLTA EVL ELA GNA EYLLA EVL ELS GNA NIWLL KFWNWR GNA EYLAA EVL ELA GNA	ARD NKKTRI I SKDLKVKRIT AKD NKKSRIV ARD NKKTRI I ARD NKKTRI I	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHIQLAVRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EELNKLLGGVT EELDSLIK-AT DELSKLLSHVS EELNKLLSGGY EELNKLLSGVT	IAQG-GVLPN IAGG-GVIPH ISQG-GVLPS HCTGVVVLPN IAQG-GVLPN	I IQAVLL PKK IHKSLIGKKI HSALL PKS IQAVLL PKK IQAVLL PKK	SATVGPKAPS ETVQDPQRK- LIKKASAAG- EKKA EKKA	GGKKATQAS GNVILS -GDSNPS	EY AY EY	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B	EYLTAEILELAGNA EYLTAEVLELAGNA EYLLAEVLELSGNA NIWLLKFWNWRGNA EYLAAEVLELAGNA	ARD NKKTRI II SKDIKVKRIT AKD NKKSRIVI ARD NKKTRI II ARD NKKTRI II ARD NKKSRI II	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHLQLAVRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EELNKLLGGVT EELDSLIK-AT DELSKLLSHVS EELNKLLSGGY EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT	IAQG-GVLPN IAGG-GVIPH ISQG-GVLPS HCTGVVVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN	I IQAVLLPKK IHKSLIGKK IHSALLPKS IQAVLLPKK IQAVLLPKK IQAVLLPKK	SATVGPKAPS ETVQDPQRK- LIKKASAAG- EKKA EKKA EKKA	GGKKATQAS	EY AY EY	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A	EYLTAEILELAGNA EYLTAEVLELAGNA EYLLAEVLELSGNA NIWLLKFWNWRGNA EYLAAEVLELAGNA EYLAAEVLELAGNA	ARD NKKTRI II SKDIKV KRITI AKD NKKSRIVI ARD NKKTRI II ARD NKKTRI II ARD NKKSRI II ARD NKKTRI II	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHIQLAVRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EELNKLLGGVT EELDSLIK-AT DELSKLLSHVS EELNKLLSGGV EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT	IAQG-GVLPM IAGG-GVIPP ISQG-GVLPS HCTGVVVLPM IAQG-GVLPM IAQG-GVLPM IAQF-FRGGI	I IQA VLL PKK I IHKSI IGKRI I IHSALL PKS I IQA VLL PKK I IQA VLL PKK I IQA VLL PKK I IQA VLL PKK	SATVGPKAPS E TVQDPQRK- L IKKASAAG- TEKKA EKKA EKKA	GGKKATQAS GNV ILS -GDSNPS	EY AY EY	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A 020927A	EYLTAEILELAGNA EYLTAEVLELAGNA EYLLAEVLELAGNA EYLLAEVLELAGNA EYLLAEVLELAGNA EYLLAEVLELAGNA EYLLAEVLELAGNA	ARD NKKTRIII SKDLKVKRIT AKD NKKSRIV ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EEL NKLLGGVT EEL DSL IK-AT DELSKLLSHVS EEL NKLLSGGY EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT	IAQG-GVLPM IAGG-GVLPS ISQG-GVLPS HCTGVVVLPM IAQG-GVLPM IAQG-GVLPM IAPR-FRGGI IAQG-GVLPM	I I QA VILL PKK I THKSTI I GKK I THSALL PKS I I QA VILL PKK I I QA VILL PKK I I QA VILL PKK VWA S	SATVGPKAPS E TVQDPQRK- L IKKASAAG- TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA	GGKKATQAS	EY AY EY	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A 020927A 022161A	EYLTAEILELAGNA EYLTAEVLELAGNA EYLLAEVLELSGNA NI WILKFWINNG GMA EYLAAEVLELAGNA EYLAAEVLELAGNA EYLAAEVLELAGNA EYLAAEVLELAGNA	ARD NKKTRII SKDLKV KRIT AKD NKKSRIV ARD NKKTRII ARD NKKTRII ARD NKKTRII ARD NKKTRII ARD NKKTRII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EEL NKLLGGVT EEL DSL IK-AT DELSKLLSHVS EEL NKLLSGGY EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT	IAQG-GVLPM IAGG-GVLPS ISQG-GVLPS HCTGVVVLPM IAQG-GVLPM IAQG-GVLPM IAPR-FRGG IAQG-GVLPM IAQG-GVLPM	I QA VIL PKK THKST I GKK THSALL PKS I QA VIL PKK I QA VIL PKK I QA VIL PKK I QA VIL PKK I QA VIL PKK	SATV GPKAPS E TVQDPQRK- LI IKKASAAG- TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA	GGKKATQAS GNV ILS -GDS NPS	EY AY EY	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A 020927A 022161A 023269A	eyiltäeilelagna eyiltäevielsgna eyiläevielsgna ni kelkfinninggna eyilääevielsgna eyilääevielsgna eyilääevielsgna eyilääevielagna eyilääevielagna eyilääevielagna	ARD NKKTRIII SKDLKVKRIT AKD NKKSRIV ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII ARD NKKTRIII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EEL NKLLGGVT EEL DSL IK-AT DELSKILSHVS EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT	IAQG-GVLPN IAGG-GVLPS ISQG-GVLPS HCTGVVVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN	I IQA VIL PKK I IHKSI I GKRI IHSALL PKS I IQA VIL PKK I IQA VIL PKK	SATV GPKAPS TVQDPQRK- LIKKASAAG- EKKA EKKA EKKA EKKA EKKA EKKA	GGKKATQAS GNVILS GDSNPS	EY AY EY	
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A 020927A 022161A 023269A 023269A	eyitte ei lelagna eyitte eti elagna eyitte evi elagna ni wit kewinne gina eyilaa evi elagna eyilaa evi elagna eyilaa evi elagna eyilaa evi elagna eyilaa evi elagna eyilaa evi elagna	ARD NKKTRI II SKDLKV KRIT AKD NKKSRIT ARD NKKTRI II ARD NKKTRI II ARD NKKTRI II ARD NKKTRI II ARD NKKTRI II	PRHLQLAIRND PRHLQLAIRGD PRHLQLAIRGD PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EEL NKLLGGVT EELDSI IK-AT DELSKLLSHVS EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT == SFPVICS	IAQG-GVLPN IAGG-GVLPS HCTGVVVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN WPSG-GVLPN	IIQAVLLPKK IIHKSLIGKKI IHSALDPKS IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK	SATV GPKAP: E TVQDPQRK- E I KKASAAG- E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA	GGGKKATQAS		
H2AX_Hsa H2Av_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A 020927A 022161A 023269A 023269A 023343A	eyitke il elagna eyitkevlelagna eyilkevlelagna eyilagevlelagna eyilakevlelagna eyilakevlelagna eyilakevlelagna eyilakevlelagna eyilakevlelagna eyilakevlelagna	ARDNKKTRII SKDLKVKRIT AKDNKKSRIV ARDNKKTRII ARDNKKTRII ARDNKKTRII ARDNKKTRII ARDNKKTRII ARDNKKTRII ARDNKKTRII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIROD PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIROD	EELNKLLGGVT EELDSIIK-AI DELSKULSHUS EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT EELNKLLSGVT 	IAQG-GVLPN IAGG-GVLPS HCTGVVVLPS HCTGVVVLPS IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN	IIQAVLLPKK ITHSJIGKK IIGAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK	SATV GPKAP: E TVQDPQRK- DI KKASAAG- E KKA F KKA F KKA F KKA F KKA F KKA F KKA G PE	GGKKATQAS		
H2AX_Hsa H2AV_Dme 012499A 000518B 003669A 020601A 020927A 022161A 023269A 02369A 023603A 025828A	EYITÄE ILELAGNA FYITÄEVIELAGNA FYITÄEVIELAGNA NI MILKEVINNORGEA FYILAREVIELAGNA EYILAREVIELAGNA EYILAREVIELAGNA EYILAREVIELAGNA FYILAREVIELAGNA FYILAREVIELAGNA	ARDNKKTRII SKDLKVREIT AKDNKKRSTVI ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII SKDLKVKRIII ARDNKKTRIII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIROD PRHIQLAVRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND	EEL NKLLGGVT BELDSI IK-AT DELSKLLSHVS BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT SPFVICS EEL NKLLSGVT EEL NKLLSGVT BELDSI IK-AT	IAQG-GVLPN IAGG-GVLPS ISQG-GVLPS HCTGVVVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN	IIQAVLLPKK IIHSLIGKK IHSLDPKS IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK IIQAVLLPKK	SATV GPKAP: T TVQDPQRK- TI IKKASAAG- E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA E KKA	GGGKKATQAS		
H2AX_Hsa H2AV_Dme 012499A 000518B 003669A 003687B 020601A 020927A 022161A 023269A 023343A 023603A 023603A 025828A 026250A	eyit xe il ella gra eyit xevi ella gra fyil avvi ella gra eyila xevi ella gra eyila aevi ella gra eyila evi ella gra	ARDNKKTRII (SKDLKVKRIT) AKDNKKTRII ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII ARDNKKTRIII (SKDLKVKRIT) ARDNKKTRIII	PRHLQLAIRND PRHLQLAIROD PRHIQLAVRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIRND PRHLQLAIROD	EEL NKLLGGVT BELDSI IK-AI DELSKLLSHVS BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT BELNKLLSGVT	IAQG-GVLPN IAGG-GVLPS ISQG-GVLPS IACG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN IAQG-GVLPN	I IQAVLLPKK I THSALLPKS I THSALLPKS I IQAVLLPKK I IQAVLLPKK	SATV GPKAP: E TVQPQR- L IKKASAAG- TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA TE KKA	GGKKATQAS		

В

Proteína	Organismo	Código	Motivo SQ (posição de S)	Quinases preditas	NetPhos 3.1 ( <i>scor</i> e)	
H2Ax	H. sapiens	NP_002096.1	140	ATM DNAPK	0,669 0,626	
H2Av	D. melanogaster	NP_524519.1	138	ATM DNAPK	0,649 0,591	
012499A	A. aegypti	AAEL012499-PA	134	ATM DNAPK	0,649 0,640	

Figura 30: Identificação da histona H2AX (H2Av) em A. aegypti.

(A) Alinhamento múltiplo entre H2AX de humano, o ortólogo funcional de *D. melanogaster* H2Av e as histonas H2A encontradas em *A. aegypti*. As histonas idênticas de *A. aegypti* foram agrupadas e somente uma sequência por grupo foi incluída no alinhamento. Os fundos cinza claro e escuro representam baixa e alta conservação dos aminoácidos, respectivamente. O fundo preto com letras brancas indica o motivo SQ. Os códigos das proteínas de *A. aegypti* foram encurtados de AAEL00000-PA para 00000A para maior clareza da figura. (B) Predição de fosforilação do motivoSQ das histonas. Apenas quinases com score acima do parâmetro de corte do NetPhos 3.5 (0,5) foram consideradas. O anexo 12 contém os códigos das histonas encontradas.

4.3.2.2. Análise de perfil de expressão da via de sinalização de DSB

O perfil de expressão dos genes que participam da sinalização de DSB foi gerado através do algoritmo *Hierarchical clustering* do Expander.

A figura 32 apresenta o perfil de expressão dos genes envolvidos na cascata de sinalização de DSB. No *heatmap* (figura 31A), é possível observar o aumento da transcrição de praticamente todos os genes desta via, em função do tratamento com paraquat. Além disso, duas isoformas do gene RAD50 foram encontradas

diferencialmente expressas, sendo elas: AAEL005245-RB (grupo 1) e AAEL025895-RA (grupo 4). Com0 dito anteriormente, RAD50 é uma subunidade do complexo MRN, envolvido na detecção de DSB. Apesar da ausência de suporte estatístico, a expressão dos genes NBN (AAEL014337-RA, AAEL023570-RA) e MRE11 (AAEL023601-RA), que codificam as outras duas subunidades do complexo MRN, aumentou em virtude do tratamento, indicando presenca de DSB e ativação da cascata de sinalização para correção desses danos. O aumento de expressão de outros genes que atuam na via após o complexo MRN, como ATM (AAEL14900-RC), p53 (AAEL023585-RA/B), MDC1 (AAEL012508-RB), RIF1 (AAEL021836-RB/C) e PAXIP1 (AAEL025635-RA) apesar de não ter suporte estatístico também é semelhante a regulação dos outros genes desta via. Embora a maioria dos genes tenha aumentado a transcrição em função do tratamento, algumas isoformas diminuíram a expressão mediante ao paraquat, sendo elas: ATM (AAEL14900-RB), RIF1 (AAEL021836-RA) e p53 (AAEL023585-RC). Entretanto, as isoformas de ATM (AAEL14900-RC), RIF1 (AAEL021836-RB/C), p53 (AAEL023585-RA/B) tiveram sua expressão aumentada (figura 31).

Por fim, o gráfico apresentado na figura 31B consiste no perfil de expressão global da cascata de sinalização de DSB, e mostra o aumento de expressão nas amostras tratadas com paraquat.



Figura 31: Perfil de expressão dos genes de sinalização de DSB em *A. aegypti*. (A) *Heatmap* de perfil de expressão dos genes de DSB. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes da via de sinalização de DSB.

#### 4.3.3. Reparo por recombinação homóloga (HR)

4.3.3.1. Identificação de proteínas relacionados ao reparo por HR em A. aegypti

A HR é responsável por reparar DSBs utilizando a região homóloga da cromátide irmã como molde para o reparo, e tem início com a ressecção das extremidades de DSB, pela proteína CtIP em associação com BRCA1 e o complexo MRN. Como já abordado no tópico 4.3.2.1, ortólogos de BRCA1 e CtIP não foram encontrados em *A. aegypti*, porém todas as proteínas que formam o complexo MRN (RAD50, MRE11 e NBN) possuem ortólogos neste inseto (figura 32). Em seguida a DSB sofre uma extensa ressecção mediada pelas proteínas EXO1 (AAEL006209-PA), DNA2 (AAEL000201-PB-PE), BLM (AAEL004039-PA) e WRN (AAEL025042-PA AAEL025042-PB-A), sendo todas encontradas em *A. aegypti* (figura 32). O complexo RPA (RPA1, RPA2 e RPA3) se liga aos terminais estabilizando-os e ativando a sinalização de ATR. Como mencionado no tópico 4.3.1.1, todas as subunidades do complexo RPA (RPA1: AAEL012826-PA, RPA2: AAEL014250-PA, RPA3: AAEL007291-PA) estão presentes em *A. aegypti* (figura 32).

A proteína RAD51 desempenha papel chave em HR, formando os filamentos invasivos de nucleoproteínas, em um processo facilitado por BRCA2 e PALB2. Os filamentos gerados são estabilizados pelos parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 e XRCC3) e a invasão ocorre em cooperação com RAD54. RAD51 (AAEL006080-PA) está presente em *A. aegypti*, entretanto apenas os parálogos RAD51C (AAEL011307-PA), RAD51D (AAEL015060-PA) e XRCC3 (AAEL027245-PA, AAEL005399-PA) foram encontrados neste mosquito. Além disso, *A. aegypti* possui ortólogo de BRCA2 (AAEL014774-PA) mas não foi possível identificar ortólogo para PALB2 (figura 32). RAD51B e PALB2 também estão ausentes em *D. melanogaster* (figura 32), enquanto *D. melanogaster* possui apenas 1 (figura 33B).

Após a invasão a fita é estendida pelas DNA polimerases replicativas (POL  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ) ou de transcrição (POL  $\eta$ ,  $\kappa$ ), formando uma estrutura denominada D-loop. As polimerases replicativas POL  $\delta$  (POLD1 - AAEL027722-PA; POLD2 - AAEL007541-PB, AAEL007541-PA; POLD3 - AAEL003935-PA) e POL  $\varepsilon$  (POLE - AAEL002800-PA; POLE2 - AAEL002785-PA; POLE3 - AAEL001764-PA; POLE4 - AAEL010085PA) possuem ortólogos em *A. aegypti*, contudo não foi possível identificar a subunidade 4 de POL  $\delta$  (POLD4). Em relação as polimerases de transcrição, apenas POL  $\eta$  (AAEL004562-PA) foi encontrada neste inseto.

Três sub vias distintas podem resolver o D-loop gerado, sendo elas: reparo de quebra na fita dupla (DSBR), anelamento de fita dependente de síntese (SDSA) ou replicação induzida por quebra (BIR).

As proteínas que participam da DSBR são: TOP3A (AAEL007683-PA), RMI1 (AAEL007058-PA), RMI2, SLX1 (AAEL018312-PA/B), SLX4, MUS81 (AAEL011993-PA-C), EME1 (AAEL009999-PA) e GEN1 (AAEL000425-PA). Com exceção de SLX4, todas as proteínas possuem ortólogos em *A. aegypti* (figura 32).

Na SDSA, a fita invasora se dissocia da cromátide irmã e anela com a fita complementar na outra extremidade da quebra, em um processo mediado pelas helicases RTEL1 (AAEL008960-PA) ou BLM (AAEL004039-PA), ambas presentes em *A. aegypti* (figura 32).

A BIR, é orquestrada por Pol 32 (ortólogo POLD3) e as helicases PIF1 e MCM2-7. Exceto a subunidade MCM4, todas as proteínas estão presentes em *A. aegypti* (POLD3 - AAEL003935-PA; PIF1 - AAEL017186-PA; MCM2 - AAEL007007-PA; MCM3 -AAEL011811-PA; MCM5 - AAEL002810-PA; MCM6 - AAEL012546-PA; MCM7 -AAEL000999-PA) (figura 32).

Na SSA, via que repara DSBs independentemente de RAD51, os terminais complementares são anelados em um processo facilitado por RAD52, proteína que se encontra ausente em *A. aegypti* e em *D. melanogaster* (figura 32B).



Figura 32: Reparo por recombinação homóloga (HR) em A. aegypti.

(A) Esquema da via de reparo por HR. Os retângulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. Os retângulos que apresentam contorno pontilhado correspondem a complexos, quando verdes significa que todos os genes do complexo estão presentes e quando azuis apenas alguns genes do complexo foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas de recombinação homóloga em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. \*Subunidades não identificadas: MCM4 (complexo MCM) em *A. aegypti* e POLD4 (POLδ) em *A. aegypti* e *D. melanogaster*. A lista completa das proteínas de HR se encontra no anexo 13

4.3.3.2. Análise de perfil de expressão da via de reparo por HR

A figura 34 apresenta o perfil de expressão dos genes envolvidos no reparo por HR, gerado pelo algoritmo *Hierarchical clustering* no Expander.

Através do *heatmap*, apresentado na figura 33A, é possível observar que, de uma maneira geral, os genes de HR aumentaram a expressão mediante ao tratamento com paraquat. Como mostrado no tópico 4.3.2.2 duas isoformas de RAD50 (AAEL025895-RA e AAEL005245-RB) foram encontradas diferencialmente expressas, e junto com o

aumento na transcrição de MBN (AAEL014377-RA e AAEL023570-RA) e MRE11 (AAEL023601-RA) sugere presença e detecção de DSBs.

As DSBs podem ser reparadas por HR ou NHEJ, sendo RAD51 a principal envolvida no reparo por HR. Apesar da ausência de suporte estatístico, RAD51 (AAEL006080-RA) teve sua expressão aumentada nas amostras tratadas com paraquat. Além disso, fatores importantes para HR, como as duas isoformas de RAD54, RAD54L (AAEL002647-RA) e RAD54B (AAEL002341-RB), e BRCA2 (AAEL014774-RA), também apresentaram elevação na transcrição em virtude do tratamento.

Entre os genes diferencialmente expresso em HR foi encontrado MCM2 (AAEL007007-PA), que participa do complexo MCM, envolvido na sub via replicação induzida por quebra (BIR). Além disso, observou-se aumento de expressão (sem suporte estatístico) nas outras subunidades do complexo MCM: MCM2 (AAEL007007-PA), MCM3 (AAEL011811-PA), MCM5 (AAEL002810-PA), MCM6 (AAEL012546-PA), MCM7 (AAEL000999-PA). Dessa forma, o aumento de expressão dos genes do complexo MCM sugere a participação da sub via BIR para reparar DSBs geradas pelo paraquat.

Além de RAD50 e MCM2, outros genes envolvidos em HR foram encontrados diferencialmente expressos, sendo eles: a subunidade de POL  $\varepsilon$ , POLE2 (AAEL002785-PA); a subunidade de POL  $\delta$ , POLD2 (AAEL007541-RB); RPA1 (AAEL012826-PA) e RFC1 (AAEL001324-PB). Entretanto, esses genes estão envolvidos em mais de uma via de reparo, não sendo específicos de HR.

Também é possível observar no *heatmap* (figura 33A) a redução na expressão de uma isoforma de DNA2 (AAEL000201-RE); RMI1 AAEL007058-RA); e da subunidade da POLε, POLE (AAEL002800-RA), nas amostras tratadas com paraquat. DNA2 possui outra isoforma (AAEL000201-RB) que aumentou a expressão em função do paraquat, além disso, a proteína codificada por este gene realiza a extensa ressecção dos terminais de DSB em conjunto com BLM (AAEL004039-PA) ou WRN (AAEL025042-RA), e ambos apresentaram elevação da transcrição nas amostras tratadas. RMI1 participa do complexo BTR, envolvido na dissolução do D-loop. Outros genes que compõem este complexo são BLM (AAEL004039-PA), que, como já mencionado, auxilia na ressecção dos terminais, e TOP3A (AAEL007683-RA). Ambos aumentaram a expressão em função do tratamento com paraquat. Em relação a POLε, é possível observar que somente a subunidade POLE (AAEL002800-PA) apresentou redução na expressão devido ao tratamento com paraquat. As subunidades POLE2 (AAEL002785-PA), POLE3

80

(AAEL001764-PA) e POLE4 (AAEL010085-PA) apresentaram expressão elevada nas amostras que sofreram tratamento com paraquat. Além disso, POLE2 foi encontrada diferencialmente expressa no grupo 1, indicando participação da POLE no reparo dos danos causados pelo paraquat.



Figura 33: Perfil de expressão dos genes de HR em A. aegypti.

(A) *Heatmap* dos genes de HR. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes de HR. (C) *Heatmap* dos genes de DSBR. (D) Gráfico de perfil de expressão dos genes de DSBR. (E) *Heatmap* dos genes de SDSA. (F) Gráfico de perfil de expressão dos genes de SDSA. (G) *Heatmap* dos genes de BIR. (H) Gráfico de perfil de expressão dos genes de BIR. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra.

## 4.3.4. Reparo por junção não homóloga de pontas (NHEJ)

# 4.3.4.1. Identificação de proteínas relacionados a NHEJ em A. aegypti

A NHEJ se inicia com a ligação do complexo Ku (KU70 e KU80) às extremidades da DSB, evitando a ressecção e recrutando a quinase DNAPKcs. Através das análises conduzidas neste trabalho foi possível encontrar, em *A. aegypti*, ortólogos para KU70 (AAEL019404-PA/B), KU80 (AAEL003684-PA) e DNAPKcs (AAEL024736-PA) (figura 34). Em *D. melanogaster*, apesar da importância da DNAPKcs em NHEJ, não foi encontrado na literatura ortólogo para esta proteína.

Subsequentemente, DNAPKcs fosforila ARTEMIS, responsável por remover nucleotídeos das extremidades. Outras proteínas envolvidas, em menor escala, nesse processo são APLF, PNKP, APTX, TDP1 e TDP2. A proteína APLF também desempenha um importante papel em NHEJ, estando envolvida no recrutamento de XRCC4-LIG4 e XLF. Através das análises de blast recíproco foi possível encontrar ortólogos para ARTEMIS (AAEL026758-PA), APLF (AAEL011254-PA-H), PNKP (AAEL014945-PB-D), APTX (AAEL025882-PA) e TDP1 (AAEL011629-P-C). Curiosamente, *D. melanogaster* não possui ortólogo de ARTEMIS.

O processamento continua com a adição de nucleotídeos pelas polimerases da família X: POL  $\mu$ , POL  $\lambda$  e TDT. Nenhum membro das polimerases da família X foi encontrado em *A. aegypti*, estando ausentes também em *D. melanogaster*.

A ligação é catalisada pelo complexo XRCC4-LIG4 em associação com XLF. Ortólogos de LIG4 (AAEL021495-PA) e XLF (AAEL021206-PA) foram encontradas em *A. aegypti*, entretanto XRCC4 está ausente neste inseto.



Figura 34: Junção não homóloga de pontas (NHEJ) em A. aegypti.

(A) Esquema da via de NHEJ. Os retângulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas de NHEJ em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. A lista completa dos genes de NHEJ se encontra no anexo 14.

4.3.4.2. Análise de perfil de expressão de NHEJ em A. aegypti

O perfil de expressão de NHEJ (Figura 35) foi gerado pelo algoritmo *Hierarchical clustering* no Expander.

O gráfico de perfil global de expressão de NHEJ (Figura 35B) indica um aumento, expressivo, na transcrição dos genes que participam desta via nas amostras tratadas com paraquat. O *heatmap* de expressão dos genes de NHEJ (Figura 35A) mostra que a transcrição de todos os genes, envolvidos nesta via, aumentou em função do tratamento com paraquat. Além disso, KU80 (AAEL003684-RA), componente do complexo Ku, que desempenha papel crucial nesta via, foi encontrado diferencialmente expresso no grupo 1. Outro importante gene de NHEJ, LIG4 (AAEL021495-RA), também foi encontrado diferencialmente expresso (grupo 1), tendo aumentado a expressão nas larvas tratadas com paraquat. LIG4 interage com XRCC4 e XLF para catalisar a ligação das extremidades, restaurando a integridade do DNA. Ademais, duas isoformas de APLF (AAEL011254-RA/B) também foram encontradas diferencialmente expressas no grupo 1.



Figura 35: Perfil de expressão dos genes de NHEJ em A. aegypti.

(A) *Heatmap* dos genes de NHEJ. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes de NHEJ.

#### 4.3.5. Reparo por erro de pareamento (MMR)

4.3.5.1. Identificação de proteínas relacionados a MMR em A. aegypti

A detecção do mal pareamento ocorre, em eucariotos, através dos homólogos de MutS (MSH2, MSH3 e MSH6), que formam os heterodímeros MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) e MutS $\beta$  (MSH2-MSH3). Em *A. aegypti*, apenas o homólogo MSH3 não foi encontrado, estando ausente também em *D. melanogaster* (figura 36). Além de MSH2, MSH3 e MSH6, outros 5 homólogos de MutS são encontrados em eucariotos: MSH1, envolvido no reparo mitocondrial em fungos; MSH4 e MSH5, relacionados a recombinação homóloga durante a meiose; MSH7, encontrada em plantas e MSH8 identificada em *Euglenozoa*. Em *A. aegypti*, foram encontrados os homólogos MSH4 (AAEL001140-PB) e MSH5 (AAEL005494-PA) (anexo 15).

Após a detecção, o heterodímero MutL é recrutado, formando um complexo com MutS. Os homólogos de MutL formam três heterodímeros funcionais, sendo eles: MutLa (MLH1-PMS2), MutL $\beta$  (MLH1-MLH3) e MutL $\gamma$  (MLH1-PMS1). Em *A. aegypti*, não foram identificados os homólogos MLH3 e PMS1, sendo assim, provavelmente apenas o heterodímero MutL $\alpha$  está presente neste inseto. Ambas ausências também acontecem em *D. melanogaster*.

Em seguida, o mau pareamento é removido pela ação da EXO1, a POL $\delta$  realiza a síntese de uma nova sequência de nucleotídeos e a LIG1 catalisa ligação do DNA. Em *A*. *aegypti*, todas a proteínas citadas acima estão presentes, com exceção da subunidade 4 de POL  $\delta$  [ausência já citada na figura 32], (figura 36).



Figura 36: Reparo por erro de pareamento (MMR) em *A. aegypti.* (A) Esquema da via de reparo por erro de pareamento. Os retângulos verdes representam genes que foram

(A) Esquema da via de reparo por erro de pareamento. Os retangulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. Os retângulos que apresentam contorno pontilhado representam complexos, quando verdes significa que todos os genes do complexo estão presentes e quando azuis apenas alguns genes do complexo foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas do reparo por erro de pareamento em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. A lista completa dos genes de MMR se encontra no anexo 15.

4.3.5.2. Análise de perfil de expressão de MMR

O algoritmo *Hierarchical clustering* foi utilizado, no Expander, para analisar o perfil de expressão dos genes de MMR (figura 37).

O gráfico de perfil de expressão de MMR sugere aumento na transcrição dos genes desta via (figura 37B).

O *heatmap* dos genes de MMR, encontrado na figura 37A, mostrou que todos os genes, com exceção de MSH6 (AAEL011780-RA), apresentam um aumento de expressão nos grupos de larvas tratadas com paraquat em relação ao grupo controle (não tratado).

Entretanto, apesar do aumento de expressão, nenhum gene específico de MMR foi encontrado diferencialmente expresso, apenas RPA1 (AAEL012826-RA), RFC1 (AAEL001324-RB) e POLD2 (AAEL007541-RB) que também participam de outras vias.



Figura 37: Perfil de expressão dos genes de MMR em A. aegypti.

(A) *Heatmap* dos genes de MMR. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes de MMR.

#### 4.3.6. Via de reparo por excisão de base (BER)

4.3.6.1. Identificação de proteínas relacionados a BER em A. aegypti

A BER se inicia com o reconhecimento e excisão da base lesionada por uma DNA glicosilase. Humanos possuem onze DNA glicosilases: UNG, TDG, SMUG, MBD4, MPG, OGG, MUTY, NTH, NEIL1, NEIL2 e NEIL3. Em *A. aegypti* apenas 3 DNA glicosilases foram encontradas, sendo elas SMUG (AAEL013286-PC) (monofuncional) e as glicosilases bifuncionais OGG (AAEL013179-PA, AAEL008148-PA/B) e NTH (AAEL003906-PA).

O próximo passo consiste na clivagem do DNA, na região do sítio abásico, pela endonuclease APE, formando uma quebra na fita simples (SSB). No caso de remoção da base por uma glicosilase bifuncional APE e PNKP precisam substituir 3'-PUA ou 3'-P por (3'-OH). Além disso, BER também repara SSBs diretamente, as quais podem ser processadas por APTX, TDP1 e PNKP. Em humanos existem dois ortólogos de APE, APE1 e APE2, entretanto, *A. aegypti* possui apenas um ortólogo de APE (AAEL010781-

PA/B). Ortólogos de PNKP (AAEL025882-PA), APTX (AAEL014945-PB-D) e TDP1 (AAEL011629-PB/C) também foram encontrados em *A. aegypti*.

Os próximos passos de BER podem prosseguir por duas vias: a via curta (SP-BER) e a via longa (LP-BER). Na via curta a POL $\beta$  sintetiza um novo nucleotídeo e o complexo XRCC1-LIG3 finaliza o reparo ligando as extremidades. Como mostrado anteriormente (tópico 4.3.4.1), as polimerases da família X, incluindo POLB, não foram encontrados em A. aegypti. Nas análises realizadas neste trabalho também não foi possível encontrar LIG3, tendo sido identificado apenas ortólogo para XRCC1 (AAEL002782-PB). Na via longa de 2-10 nucleotídeos são deslocados e removidos da fita de DNA, e uma nova cadeia nucleotídica é sintetizada e incorporada ao DNA. Diversas proteínas participam da via longa, incluindo FEN1, PCNA, RFC, RPA, PARP1/2, LIG1 e POLδ/ε/β. Em A. aegypti, foram encontrados ortólogos para FEN1 (AAEL005870-PB), LIG1 (AAEL017566-PB/C), PCNA (AAEL012545-PA) e todas as subunidades dos complexos RFC (RFC1 - AAEL001324-PB; RFC2 - AAEL020929-PA, RFC3 - AAEL007581-PA, AAEL024947-PA; RFC4 - AAEL006788-PA; RFC5 -AAEL009465-PA), RPA (RPA1 - AAEL012826-PA; RPA2 - AAEL014250-PA; RPA3 - AAEL007291-PA) e POLɛ (POLE - AAEL002800-PA; POLE2 - AAEL002785-PA; POLE3 - AAEL001764-PA; POLE4 - AAEL010085-PA). Entretanto, do complexo POLS (POLD1 - AAEL027722-PA; POLD2 - AAEL007541-PA/B; POLD3 -AAEL003935-PA), apenas a subunidade POLD4 não foi identificada. Somente um ortólogo de PARP (AAEL011815-PA) foi encontrado, o qual se mostrou mais similar a PARP1.



Figura 38: Reparo por excisão de base (BER) em A. aegypti.

(A) Esquema de BER. Os retângulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. Os retângulos que apresentam contorno pontilhado representam complexos, quando verdes significa que todos os genes do complexo estão presentes e quando azuis apenas alguns genes do complexo foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas do reparo por excisão de base em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. A listagem completa das proteínas de BER se encontra no anexo 16.

#### 4.3.6.2. Análise de perfil de expressão de BER

O Expander foi empregado para gerar o perfil de expressão de BER, tendo sido utilizado o algoritmo *Hierarchical clustering*.

A figura 39 mostra o *heatmap* e o gráfico de perfil de expressão dos genes de BER, sendo possível observar um aumento na transcrição dos genes relacionados a esta via.

Através do *heatmap* (figura 39A) é possível observar que a maioria dos genes aumentaram a expressão nas amostras tratadas com paraquat. Além disso, genes cruciais para BER e RDD foram encontrados diferencialmente expressos, sendo eles PARP (AAEL011815-PA) e XRCC1 (AAEL002782-PB). PARP é responsável por reconhecer regiões de SSB e DSB e sintetizar cadeias de polímeros de ADP-ribose (pAR), que funciona para o recrutamento da proteína de ancoragem XRCC1. Dessa forma, o aumento de expressão, com suporte estatístico, de PARP e XRCC1, pode indicar a ativação de LP-BER.

Entre os genes diferencialmente expressos, como mencionado anteriormente, foram encontradas as subunidades RFC1 (AAEL001324-PB) e RPA1 (AAEL012826-RA) apresentando aumento na expressão em 6h (grupo 4) e em 24h (grupo 1), respectivamente. POLD2 (AAEL007541-RB) também foi encontrada diferencialmente expressa no grupo 1.

Todavia, foi observada a redução na expressão de alguns genes, sendo eles: as isoformas de APE1 (AAEL010781-RA) e HMGB1 (AAEL011414-RF), e a unidade de Polɛ, POLE (AAEL002800-RA), já mencionado anteriormente. Porém, como é possível observar, as isoformas APE1 (AAEL010781-RB) e HMGB1 (AAEL011414-RE) aumentaram a expressão mediante ao tratamento com paraquat. Como já dito anteriormente, as subunidades POLE2 (AAEL002785-PA), POLE 3 (AAEL001764-PA) e POLE4 (AAEL010085-PA) elevaram a transcrição nas amostras tratadas com paraquat. Além do mais, POLE2 foi encontrada diferencialmente expressão no grupo 1, sugerindo participação da POLε no reparo dos danos oxidativos gerados pelo paraquat.



Figura 39: Perfil de expressão dos genes de BER em *A. aegypti*. (A) *Heatmap* dos genes de BER. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes de BER.

# 4.3.7. Via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER)

4.3.7.1. Identificação de proteínas relacionados a BER em A. aegypti

Em NER o reconhecimento do dano pode ocorrer por duas sub vias, o reparo do genoma global (GG-NER) e o reparo acoplado à transcrição (TC-NER). A GG-NER, é orquestrada por dois complexos: XPC (XPC, HR23B e CENT2) e UV-DDB (XPE), constituído por DDB1, BBD2, CUL4 e RBX1. Em *A. aegypti*, foram encontrados ortólogos para XPC (AAEL003897-PB, AAEL003893-PA, AAEL018259-PB, AAEL003868-PA) e HR23B (AAEL002077-PA) do complexo XPC, e DDB1 (AAEL002407-PB), CUL4 (AAEL003466-PC-K) e RBX1 (AAEL004691-PA/B) de UV-DDB. Não foram encontrados ortólogos para as subunidades CENT2 e DDB2 dos complexos XPC e UV-DDB, respectivamente. Em TC-NER o bloqueio da elongação da RNA polimerase serve como um sinal para o recrutamento de CSA e CSB, iniciando NER. Curiosamente, ambas não foram encontradas em *A. aegypti*.

A próxima etapa (comum as sub vias) consiste no recrutamento do complexo TFIIH, o qual é composto por dez subunidades, compreendendo um núcleo central (XPB, XPD, TTDA, TFIIH1, TFIIH2, TFIIH3, TFIIH4) associado ao subcomplexo CAK (CDK7, CCNH, MNAT1). Ortólogos para todas as subunidades de TFIIH foram identificados em *A. aegypti*.

A excisão do dano é catalisada pelo complexo XPF-ERCC1 (5') e por XPG (3'). POL  $\delta$ ,  $\varepsilon$  ou  $\kappa$  sintetiza um novo fragmento, enquanto a ligação é catalisada por LIG1 ou pelo complexo XRCC1-LIG3. Com exceção da subunidade 4 de POL  $\delta$  e de LIG3 (mostrado no tópico 4.3.6.1), todas as proteínas estão presentes em *A. aegypti* (figura 40).



Figura 40: Reparo por excisão de nucleotídeo (NER) em A. aegypti.

(A) Esquema de NER. Os retângulos verdes representam genes que foram encontrados em *A. aegypti* e os brancos mostram genes que não foram encontrados. Os retângulos de contorno pontilhado representam complexos, quando verdes significa que todos os genes do complexo estão presentes e quando azuis apenas alguns genes do complexo foram encontrados. (B) *Heatmap* mostrando a presença das proteínas do reparo por excisão de nucleotídeo em humanos (Hsa), *D. melanogaster* (Dmel) e *A. aegypti* (Aag). Os quadrados azuis indicam presença da proteína, enquanto os amarelos ausência. A tabela completa contando os códigos das proteínas está no anexo 17.

## 4.3.7.2. Análise de perfil de expressão de NER

O perfil de expressão dos genes envolvidos em NER foi gerado através do algoritmo *Hierarchical clustering*, no Expander.

O *heatmap* dos genes de NER e o gráfico de perfil de expressão dos genes de NER encontram-se na figura 41. É possível observar que a expressão dos genes de NER aumentou nas amostras tratadas com paraquat (figura 41B). Todos os genes de NER, com exceção, da já citada, subunidade de POL<sub>E</sub>, POLE (AAEL002800-RA), e uma isoforma de CUL4 (AAEL003466-RC), apresentaram aumento de expressão nas amostras que sofreram tratamento com paraquat.

Além disso, três genes essenciais que possuem papel crucial para NER, foram encontrados diferencialmente expressos (grupo 1), sendo eles: XPC (AAEL018259-RB), HR23B (AAEL002077-RA) e XPB (AAEL013205-RA). XPC e HR23B interagem formando o complexo XPC, responsável por detectar danos que causam alterações estruturais na sub via GG-NER. XPB é uma helicase componente do complexo TFIIH, que juntamente com XPD realiza a abertura da fita em torno do dano. Apesar da ausência de suporte estatístico, é possível observar elevação da transcrição dos genes de NER, incluindo XPD. Ademais, como mencionado anteriormente, as subunidades RPA1 (grupo 1), RFC1 (grupo 4) POLD2 (AAEL007541-RB) e POLE2 (AAEL002785-RA) também se encontram diferencialmente mais expressas, além de XRCC1 (grupo 1).

O gráfico de perfil de expressão de NER (figura 41B) também aponta para aumento na transcrição dos genes de NER. Sendo assim, os resultados indicam ativação desta via em função do tratamento com paraquat.



Figura 41: Perfil de expressão dos genes de NER em *A. aegypti*. (A) *Heatmap* dos genes de NER. Os genes sinalizados com asterisco estão diferencialmente expressos, o número ao lado corresponde ao grupo de perfil de expressão (figura 18) no qual ele se encontra. (B) Gráfico de perfil de expressão dos genes de NER.

4.4.PCR quantitativo (qPCR)

O qPCR foi feito para validar alterações de expressão identificadas no transcriptoma. Dessa forma, 7 genes de RDD, diferencialmente expressos, foram escolhidos, sendo deles: RAD9 (AAEL010759-RA), XPC (AAEL018259-RB), XPB (AAEL013205-RA), XRCC1 (AAEL002782-RB), PARP (AAEL011815-PA), TOPBP1 (AAEL013962-RB) e RFC1 (AAEL001324-RB).

O resultado do qPCR encontra-se nas figuras 42, 43 e 44. Os genes RAD9 (figura 43A), XRCC1 (figura 42B), PARP1 (figura 42C) e XPC (figura 42D) apresentaram expressão semelhante ao observado no transcriptoma, entretanto o perfil de expressão de XPB (figura 42E), TOPBP1 (figura 43) e RFC1 (figura 44) foi diferente do encontrado no transcriptoma.

No transcriptoma o gene XPB apareceu diferencialmente expresso no grupo 1, indicando aumento de expressão em 24h de tratamento. Todavia, no qPCR, a expressão de XPB (figura 42E) não variou, uma vez que não demonstrou alteração de expressão entre as amostras tratadas e a controle.

No caso de TOPBP1, o transcriptoma demonstrou redução da expressão em 24h, uma vez que este gene foi encontrado diferencialmente expresso no grupo 2. Em

contrapartida, o qPCR indica baixa expressão deste gene no controle, um aumento na transcrição nos tempos 6h e 12h, seguido da redução de expressão em 24h.

Em relação a RFC1, diferencialmente expressa no grupo 4, o transcriptoma mostrou uma expressão proeminente em 6h e posterior redução na transcrição em 12h e 24h. Entretanto, o qPCR indica um aumento de expressivo, condizente com o perfil do grupo 1.



Figura 42: Gráficos de qPCR para os genes diferencialmente expressos no grupo 1. (A) RAD9. (B) XRCC1. (C) PARP1. (D) XPC. (E) XPB. Os gráficos de barras representam média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. O asterisco indica suporte estatístico em relação ao controle (p<0,05).



Figura 43: Gráfico de qPCR para TOPBP1 diferencialmente expressa no grupo 2. O gráfico de barras representa média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.



Figura 44: Gráfico de qPCR para RFC1, diferencialmente expresso no grupo 4.

O gráfico de barras representa média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. O asterisco indica suporte estatístico em relação ao controle (p<0,05).

# 5. DISCUSSÃO

O *A. aegypti* é atualmente um dos insetos vetores de maior importância na saúde pública mundial, devido a sua capacidade de transmitir as arboviroses Dengue, Zika, Chikungunya, febre amarela e Mayaro (ALONSO-PALOMARES et al., 2019; POWELL, 2018). Este díptero da família Culicidae é encontrado em regiões tropicais e subtropicais, estando completamente adaptado ao ambiente urbano (CLEMONS et al., 2010). A transmissão de doenças ocorre durante o repasto sanguíneo, realizado pelas fêmeas, para garantir o desenvolvimento e maturação dos ovos (VALLE; NACIF PIMENTA; AGUIAR, 2016).

Devido a sua importância médica, estudos com o objetivo de entender sua biologia e outros aspectos são fundamentais para o maior conhecimento deste vetor e melhoramento de técnicas de controle.

No presente trabalho, larvas do mosquito *A. aegypti* foram submetidas ao estresse oxidativo gerado pelo paraquat, e analisadas através da metodologia de RNA-seq. O paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium) é um herbicida que atua induzindo o estresse oxidativo através do aumento na produção de radicais livres, associado à depleção dos mecanismos antioxidantes. A redução do paraquat durante o ciclo redox forma o radical  $PQ^+$  que é rapidamente re-oxidado formando  $PQ^{2+}$ , gerando ânion superóxido ( $O^{2-}$ ). A subsequente redução do ânion superóxido acarreta na geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila (°OH) (FUKUSHIMA et al., 2002; GAWARAMMANA; BUCKLEY, 2011). Este herbicida é comumente utilizado para estudar estresse oxidativo em diversos modelos, já tendo sido amplamente empregado, em *D. melanogaster*, para mensurar a resistência adquirida ao estresse oxidativo (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013; RZEZNICZAK et al., 2011).

O tratamento com paraquat alterou significativamente a expressão de 1848 genes, os quais foram agrupados em cinco perfis de expressão (figura 18). Devido a diferença de expressão entre os genes do controle e das amostras tratadas por 24h nos grupos 1, 2 e 5, é possível sugerir que estas modificações ocorreram em virtude do tratamento com paraquat. Todavia, em relação aos grupos 3 e 4, devido a semelhança entre as amostras controle e 24h, não é possível afirmar que as alterações transcricionais visualizadas ao longo do tempo ocorreram devido ao paraquat. Apesar desta ser uma das possibilidades, uma variação causada pelo próprio desenvolvimento da larva também é possível.

Em virtude do seu mecanismo de ação, o paraquat é tóxico para a mitocôndria. Sua redução pelo complexo I, também denominado NADH desidrogenase, promove o aumento da produção de superóxido acarretando na despolarização da membrana interna e no aumento de volume da matriz mitocondrial (GAWARAMMANA; BUCKLEY, 2011). As larvas de A. aegypti, tratadas com paraquat, sofreram uma drástica redução na transcrição de genes envolvidos na cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa, associado ao aumento da expressão de genes relacionados a mitofagia (figuras 20-24). De fato, alguns estudos já demonstraram a influência do paraquat no metabolismo energético. No hipocampo de ratos tratados com paraquat (8 mg/kg) a concentração de ATP reduziu significativamente em comparação com o controle, sugerindo uma disfunção mitocondrial causada pelo paraquat (CHEN et al., 2010). A mitofagia consiste no mecanismo de autofagia da mitocôndria, sendo um processo crucial para a manutenção da qualidade destas organelas e homeostase do organismo. A indução da mitofagia pelo paraquat ocorre em resposta a produção excessiva de superóxido e a consequente despolarização da mitocôndria (GEORGAKOPOULOS; WELLS; CAMPANELLA, 2017). Além disso, o excesso de EROs acarreta a disfunção mitocondrial, acionando a mitofagia para eliminar mitocôndrias danificadas e manter a homeostasia, fato que explica o aumento da transcrição de genes envolvidos com o processo de autofagia mitocondrial.

A supressão da fosforilação oxidativa ocorreu em conjunto com a diminuição da expressão de genes envolvidos no ciclo do ácido cítrico, no catabolismo de ácidos graxos e no metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Essas modificações mostram uma lógica metabólica de diminuição na produção de precursores da cadeia transportadora de elétrons (NADH e FADH2) por várias abordagens: 1) diretamente pela diminuição do ciclo do ácido cítrico e do catabolismo de ácidos graxos, 2) pela diminuição de precursores do ciclo do ácido cítrico através da diminuição do metabolismo de carboidratos e 3) pela diminuição de intermediários do ciclo do ácido cítrico pela diminuição de aminoácidos. A supressão do ciclo do ácido cítrico em função do paraquat já foi demonstrada em *D. melanogaster*. A exposição aguda de moscas adultas ao paraquat (20 mM e 40 mM) reduziu a atividade das enzimas succinato desidrogenase e citrato sintase (HOSAMANI; MURALIDHARA, 2013).

O metabolismo de pirimidinas também foi suprimido em função do estresse oxidativo gerado pelo paraquat. A biossíntese *de novo* de pirimidinas é um processo catalisado pela enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), uma flavoproteína presente na membrana mitocondrial interna, que necessita do complexo III para exercer sua função (KHUTORNENKO et al., 2010). Como discutido anteriormente, o paraquat acarretou a redução da expressão de genes relacionados a fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons, incluindo genes do complexo III (figuras 25 e 26). Dessa forma, a redução na transcrição de genes envolvidos no metabolismo de pirimidinas pode ter ocorrido em virtude da supressão destes processos. Além disso, já foi demonstrado que a redução da biossíntese *de novo* de pirimidina desencadeia a ativação do p53 em resposta aos inibidores do complexo III, sugerindo que a supressão destas vias é importante para ativação da RDD (KHUTORNENKO et al., 2010).

Dessa forma, a alteração na expressão dos genes envolvidos no metabolismo energético e metabolismo de nitrogênio, associado aos genes de mitofagia mostram um quadro celular de dano mitocondrial relacionado ao aumento na produção de EROs, em virtude do tratamento com paraquat.

O tratamento com paraquat também influenciou na expressão de genes envolvidos na transcrição do DNA e síntese de proteínas, indicando uma resposta transcricional para combater os possíveis danos. Como dito anteriormente, a RDD ativa diversas respostas celulares como o arresto do ciclo celular, ativação transcricional de genes, senescência e apoptose (SIRBU; CORTEZ, 2013). A ausência de vias de apoptose entre as categorias enriquecidas, e o aumento de expressão de genes envolvidos no reparo e na resposta ao estresse, sugerem uma tentativa das larvas em lidar com os danos gerados sem acionar mecanismos de morte celular programada. Além disso, o aumento na expressão de genes envolvidos na transcrição do DNA e síntese de proteínas, indicam que as larvas estão tentando se adaptar ao ambiente rico em ROS ao invés de ativar apoptose.

Além de danos mitocondriais o aumento da produção de EROs pode ocasionar outras complicações celulares como lesões ao DNA, proteínas e peroxidação de lipídeos (GRAÇA-SOUZA et al., 2006). Nas larvas de *A. aegypti*, o tratamento com 0,5 mM de paraquat, durante 6h, 12h e 24h acarretou a ativação dos mecanismos de resposta ao estresse e resposta ao dano ao DNA (RDD) que serão discutidos adiante.

Entre os genes relacionados com a resposta ao estresse foram encontradas três isoformas de ferritina (AAEL007383-PE-G) e a proteína de choque térmico DNAJ (AAEL003366-PA). A ferritina é uma proteína armazenadora de ferro que possui um papel importante na regulação do estresse oxidativo. Primeiramente, ela evita a formação de EROs através da regulação da concentração celular de ferro livre, o qual catalisa a produção de de EROs através da reação de Fenton. Além disso, em resposta ao estresse

oxidativo, a ferritina é capaz de se ligar a p53 estimulando a sua atividade transcricional; e ao DNA, protegendo-o de danos oxidativos (LEE et al., 2009). O aumento da expressão de ferritina mediante ao tratamento com paraquat já foi demonstrado em D. melanogaster (GIRARDOT; MONNIER; TRICOIRE, 2004). Além disso, a ferritina também apresentou aumento da transcrição em células da linhagem Aag2 de A. aegypti tratadas com heme e no intestino de fêmeas alimentadas com sangue (BOTTINO-ROJAS et al., 2015). O heme é o grupamento prostético da hemoglobina, principal proteína do sangue, sendo formado por um anel de protoporfirina IX e um átomo de Fe<sup>2+</sup> (BELCHER et al., 2010). Nos intestinos de fêmeas a hemoglobina é digerida acarretando na liberação de heme, que quando livre torna-se tóxico devido ao seu potencial pró oxidante (OLIVEIRA et al., 2011; PAIVA-SILVA et al., 2006). Em adição, a degradação do heme pela heme oxigenase liberta o ferro que, como discutido anteriormente, produz EROs através da reação de Fenton (LIMA et al., 2012). Dessa forma, é possível afirmar que o aumento da expressão de ferritina, mediante ao tratamento com paraquat consiste, em um mecanismo adaptativo em resposta a elevação de EROs. Como dito anteriormente, a proteína de choque térmico, DNAJ também teve sua expressão aumentada nas larvas tratadas com paraquat. A elevação da expressão de proteínas de choque térmico em função do estresse oxidativo, gerado pelo heme, já foi demonstrado (BOTTINO-ROJAS et al., 2015). Ademais, a interação entre a DNAJ e a proteína PCNA, já identificada na planta Oryza sativa, sugere participação de DNAJ na RDD (YAMAMOTO et al., 2005).

Um dos principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo consiste no sistema antioxidante enzimático, formado pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPX), tioredoxina, tioredoxina peroxidase e tioredoxina redutase. O aumento de expressão destas enzimas em função do tratamento com paraquat e com heme já foi demonstrado\_em células da linhagem Aag de *A. aegypti* e *D. melanogaster* (BOTTINO-ROJAS et al., 2015; GIRARDOT; MONNIER; TRICOIRE, 2004). Entretanto um estudo realizado em células do epitélio renal de ratos (linhagem NRK-52E) mostrou uma diminuição na atividade total de catalase e SOD (associado a redução da expressão) após tratamento com paraquat (SAMAI et al., 2011). Condizente com a literatura, diversas variantes de GST e GPX aumentaram de expressão nas larvas tratadas com paraquat, incluindo GSTT2 (AAEL009016-RB) que está diferencialmente expressa no grupo 1. Entretanto, foi observado a redução na expressão de outras variantes, como a GSTT4 (AAEL004229-RA), GSTE3 (AAEL007947-RA), GSTT1 (AAEL009017-RA) e GSTT3 (AAEL025979-RA), diferencialmente expressas

no grupo 2. Este resultado sugere que as variantes de GST e GPX possuem uma regulação independente em resposta ao estresse oxidativo. Ademais, os diferentes perfis de expressão das GSTs e GPXs indicam atuação das variantes em função do acúmulo de danos. A enzima superóxido dismutase (SOD), como o próprio nome diz, catalisa a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio (H2O2) e oxigênio (O2). A MnSOD2 (AAEL025388-RA) teve sua expressão reduzida, com suporte estatístico, em função do tratamento com paraquat, tendo sido observado um aumento nas amostras tratadas por 6h seguido de uma drástica diminuição em 24h. O mesmo perfil de expressão foi encontrado para CuSOD3 (AAEL019937-RA), enquanto a transcrição de CuSOD1 (AAEL019759-RA), CuSOD2 (AAEL006271-RD) e CuSOD4 (AAEL019938-RA) aumentou em 12h e 24h de tratamento. Dessa forma, por ser uma enzima mitocondrial, MnSOD2 é, possivelmente, a defesa inicial contra EROs gerados pelo paraquat, uma vez que a mitocôndria é o principal sítio de produção de EROs induzida por este herbicida. Ademais, a posterior redução na transcrição de MnSOD2 pode estar associada a mitofagia, uma vez que MnSOD2 apresenta um perfil de expressão semelhante aos genes relacionados a fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons. Outra importante enzima antioxidante, a catalase (AAEL013407-RB), responsável por converter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, também foi encontrada diferencialmente expressa no grupo 2. Todavia outra isoforma (AAEL013407-RA) teve sua transcrição aumentada em virtude do tratamento com paraquat, sugerindo uma alteração na região de splicing em função do estresse oxidativo. O sistema antioxidante tioredoxina é formado pelas enzimas tioredoxina peroxidase e redutase. A maioria dos genes deste sistema aumentaram a expressão nas larvas tratadas com paraquat, principalmente nas amostras tratadas por 12h e 24h (figura 27C). Ademais, TRXL (AAEL008291-RA) e TPX4 (AAEL002309-RA) foram encontrados diferencialmente expressos no grupo 1. O aumento de expressão em função do tratamento com paraquat sugere participação do sistema tioredoxina no combate aos EROs gerados por este herbicida, principalmente nos tempos 12h e 24h.

Outro importante mecanismo de detoxificação consiste no efluxo de substâncias danosas pelos transportadores de cassetes de ligação ao ATP (transportadores ABC). Estes transportadores estão envolvidos no transporte de substâncias através das membranas, e encontram-se enriquecidos no grupo 1. O aumento de transcrição dos transportadores ABC em resposta ao paraquat já foi demonstrado em espécies de plantas do gênero *Conyza* (MORETTI et al., 2017). Além disso, em *D. melanogaster*, o paraquat induz aumento de expressão do gene que codifica a proteína *multidrug resistance-*

*associated protein 4* (MRP4). Esta proteína é um componente da subfamília MRP/ABCC de transportadores ABC, e já foi relacionada com processos de detoxificação. Os genes que codificam membros da subfamília ABC, MPR1 (AAEL004743-PO, AAEL019847-PA) e MPR9 (AAEL005043-RA) tiveram sua expressão elevada nas larvas tratadas com paraquat durante 24h, indicando uma tentativa de remoção do paraquat do meio intracelular.

Apesar do esforço celular em evitar danos gerados pelo paraquat através dos mecanismos de detoxificação, dos transportadores ABC e da regulação metabólica para diminuir a respiração celular, o metabolismo de nitrogênio e a ativação da mitofagia; a presença de genes fundamentais para RDD evidencia o combate a lesões no DNA. Entre os genes encontrados nestas categorias estão PARP (AAEL011815-RA) e HPF1 (AAEL001300-RA), que desempenham papel crucial na RDD. PARP promove o recrutamento de diversas proteínas de reparo, através do reconhecimento de regiões de SSB e DSB e da síntese de cadeias de polímeros de ADP-ribose (ADPr) (YELAMOS et al., 2011). Recentemente HPF1 foi identificado como parceiro de PARP, e sua ausência implica na perda de eficiência desta proteína (GIBBS-SEYMOUR et al., 2016). Estudos demonstraram que, em resposta ao dano ao DNA, PARP e HPF1 interagem promovendo a síntese de serina-ADPr (Ser-ADPr), sendo a serina o principal resíduo modificado por ADPr em função de danos ao DNA (BONFIGLIO et al., 2017). Dessa forma, a presença de PARP e HPF1 nas categorias enriquecidas, sugere a presença de danos ao DNA e evidencia o aumento de expressão destes genes para corrigir os danos gerados pelo paraquat.

Genes relacionados ao reparo de DSB também foram encontrados diferencialmente expressos. As DSBs são lesões potencialmente danosas, que podem acarretar instabilidade genômica (IYAMA; WILSON, 2013). A correção desse tipo de dano pode ocorrer através de HR ou NHEJ, sendo a última a principal via de reparo de DSB em eucariotos (RODGERS; MCVEY, 2016). Como DSB consiste em um dos tipos de danos ocasionados por estresse oxidativo, a alteração de expressão de genes relacionados a NHEJ era esperado. De fato, KU80 (AAEL003684-RA), APLF (AAEL011254-RA/B) e LIG4 (AAEL021495-RA), foram encontrados diferencialmente expressos, evidenciando a participação de NHEJ no reparo de DSBs geradas pelo paraquat.

Outros genes importantes na RDD também foram encontrados diferencialmente expressos, sendo eles: RAD9 (AAEL010759-RA), XPC (AAEL018259-RB), XPB

### 5.1.Estudo da RDD em A. aegypti

Com o crescimento da tecnologia de edição de genomas, o uso desta metodologia para controle e criação de insetos que não sejam capazes de propagar doenças vem se expandindo. Alguns métodos de engenharia genômica já foram aplicados em A. aegypti, como por exemplo ZFNs, HEs, TALENs e CRISPR-Cas9 (ARYAN et al., 2013b; ARYAN; MYLES; ADELMAN, 2014; DEGENNARO et al., 2013; KISTLER; VOSSHALL; MATTHEWS, 2015; MA et al., 2014; MCMENIMAN et al., 2014). Essas técnicas introduzem uma quebra na dupla fita (DSB) no genoma que, posteriormente, será reparada pelos mecanismos de reparo de DSB. Sendo assim, as vias de reparo que corrigem DSB, HR e NHEJ, são fundamentais para as técnicas de manipulação genômica. Em virtude das peculiaridades de cada via, o resultado depende de qual via será utilizada para reparar a DSB. Na NHEJ o reparo ocorre através da união das extremidades quebradas, sendo mais propenso a erros, resultando na introdução de pequenas inserções ou deleções na região da quebra. Dessa forma, NHEJ é eficiente para nocautear genes de interesse. O reparo por HR é mais preciso, uma vez que a região homóloga da cromátide irmã é utilizada como molde, conferindo maior acurácia ao processo. Logo, HR é empregada na adição de transgenes através de um modelo e na correção de genes contendo mutações (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016). Em eucariotos, a NHEJ é a principal via de reparo de DSB, ocorrendo em todas as fases do ciclo celular, enquanto HR é viável apenas nas fases S e G2 do ciclo, quando a cromátide irmã está disponível para servir como molde (IYAMA; WILSON, 2013). Um dos principais desafios das técnicas de edição genética é a regulação das vias de DSB, e o direcionamento para HR quando o objetivo for a adição de genes específicos ao genoma. Por exemplo, o uso de HE e TALENs para edição genética em A. aegypti induz o reparo via NHEJ e SSA (ARYAN et al., 2013a). Tentativas de silenciar NHEJ para que o reparo ocorra por HR já foram feitas para A. aegypti, porém não obtiveram sucesso (BASU et al., 2015). Apesar do uso crescente de técnicas de edição de genomas em insetos vetores pouco se sabe sobre a RDD nestes organismos. Dessa forma, conhecer as vias de reparo e sua regulação é de suma importância para o correto estabelecimento das técnicas de manipulação genômica.

A RDD consiste em um complexo sistema de mecanismos encarregado de manter a integridade genômica. De uma maneira geral, a RDD é coordenada por proteínas "sensores", mediadoras, transdutoras, e efetoras, que são responsáveis por detectar danos a estrutura do DNA, sinalizar e ativar as vias de reparo, os mecanismos de controle do ciclo celular e, quando necessário, apoptose (SIRBU; CORTEZ, 2013).

A quinase ATR é uma das principais proteínas transdutoras de sinal em DDR, sendo capaz de reconhecer regiões de ssDNA-RPA, estrutura gerada pelo estresse de replicação e durante a ressecção dos terminais de DSB, necessária para iniciar HR. As proteínas envolvidas na sinalização de ATR emergiram em eucariotos basais, com exceção de ATRIP que surgiu em plantas e CHK1 que apareceu antes da separação entre animais e fungos (ARCAS et al., 2014). A conservação dessa via de sinalização justifica todas as proteínas terem sido encontradas em *A. aegypti*, as quais também estão presentes em *D. melanogaster*, sugerindo que essa via seja funcional em *A. aegypti*.

De maneira geral, a expressão dos genes de RDD aumentou em virtude do tratamento com paraquat, indicando ativação desta via. A subunidade RPA1 (AAEL012826-RA), do complexo RPA, foi encontrada diferencialmente expressa, com expressão pronunciada em 24h (grupo 1). O complexo RPA desempenha um papel crucial na via de sinalização de ATR, ele se liga a regiões de ssDNA, estabilizando-as e coordenando o recrutamento de ATR através de ATRIP (ZOU; LIU; ELLEDGE, 2003). Ademais, dois importantes genes foram encontrados diferencialmente expressos, sendo eles RAD9 (AAEL010759-RA) e TOPBP1 (AAEL013962-RB). RAD9 teve sua expressão aumentada em larvas tratadas com paraquat por 24h (grupo 1), enquanto, curiosamente, TOPBP1 diminuiu sua expressão em função do tratamento com paraquat (grupo 2). RAD9 consiste em uma subunidade do complexo sensor 9-1-1, constituído por RAD9, RAD1 e HUS1, que recruta TOPBP1, necessária para completa ativação de ATR. A interação entre o complexo 9-1-1 e TOPBP1 se dá, justamente, por RAD9 fosforilada e o triplete de BRCT presente na porção C-terminal de TOPBP1 (RAPPAS; OLIVER; PEARL, 2011). Dessa forma, por serem proteínas parceiras e devido a importância de TOPBP1 para a cascata de sinalização de ATR, era esperado que este gene aumentasse a sua expressão como RAD9. Sendo assim, para confirmar as alterações de expressão de RAD9 e TOPBP1 foram desenhados iniciadores de qPCR para esses genes. Através do qPCR foi possível validar o aumento de expressão de RAD9, porém o resultado obtido para TOPBP1 foi diferente do encontrado no transcriptoma. O qPCR mostrou aumento da expressão de TOPBP1 nas amostras tratadas com paraquat durante 6h e 12h e uma redução, a níveis semelhantes ao do controle em 24h de tratamento. Como TOPBP1 é um fator importante para completa ativação de ATR, além de interagir com RAD9, o resultado do qPCR é mais condizente com a função de TOPBP1 e com o tipo de tratamento que as larvas receberam.

Outra importante proteína transdutora de sinal é quinase ATM, a qual é ativada em virtude que DSB, estando envolvida na fosforilação de diversas proteínas da cascata de sinalização de DSB (CICCIA; ELLEDGE, 2010). Essa via possui várias etapas de regulação, que se originaram de maneira modular, uma vez que seus componentes emergiram em períodos evolutivos diferentes (ARCAS et al., 2014). Em *A. aegypti* algumas proteínas importantes da sinalização de DSB não foram encontradas, como: RNF8, PIAS4, TP53BP1, CtIP, e as proteínas que formam o complexo BRCA1-A (BRCA1, BARD1, RAP80, ABRAXAS, BRCC3, BRE, BABAM1).

A RNF8 participa do processo de ubiquitinação inicial de H2A/H2AX, servindo como um sinal para a poliubiquitinação realizada por RNF168 (COSTER; GOLDBERG, 2010; DOIL et al., 2009; HUEN et al., 2007). Arcas et. al detectou RNF8 em eucariotos basais, entretanto, observou a presença de RNF168 apenas em Chordata. Além disso, ambas estão ausentes em *D. melanogaster* (ARCAS et al., 2014). Curiosamente, em *A. aegypti* foi encontrado apenas ortólogo para RNF168 (AAEL001357-PA), sugerindo que talvez esta possa estar fazendo o papel de RNF8 neste inseto.

As proteínas do complexo BRCA1-A, CtIP e TP53BP1 estão diretamente envolvidas na escolha entre HR e NHEJ. Nas fases S e G2 do ciclo celular CtIP e BRCA1 se associam, promovendo HR. CtIP emergiu em Bilateria, entretanto, *D. melanogaster* possui ortólogo desta proteína (ARCAS et al., 2014; SEKELSKY, 2017). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o gene Sae2 codifica uma proteína homóloga de CtIP, que inicia a ressecção de DSB junto com a subunidade MRE11 do complexo MRX (MRN em humanos) (APARICIO; BAER; GAUTIER, 2014). Como CtIP se originou apenas em Bilateria (ARCAS et al., 2014), e outros organismos como *D. melanogaster* e *S. cerevisiae* possuem ortólogos funcionais de CtIP, é possível que *A. aegypti* também possua um ortólogo funcional de CtIP, ou seja, uma endonuclease que desempenhe esse papel, mas que não foi encontrada. O complexo BRCA1-A é bastante conservado, e seus componentes BRCA1, BRE e BRCC3, emergiram em eucariotos basais, enquanto NBA1 e BARD1 se originaram antes da divisão de planta. Apenas RAP80 possui origem tardia, aparecendo apenas após a divisão de vertebrados (ARCAS et al., 2014). Esse complexo também está ausente em *D. melanogaster* e sua ausência em Diptera já foi reportada (ARCAS et al., 2014; SEKELSKY, 2017). Apesar da inexistência das proteínas do complexo BRCA1-A, existe evidência de HR nesses insetos (RONG; GOLIC, 2003; STAEVA-VIEIRA; YOO; LEHMANN, 2003; YOO; MCKEE, 2005), sugerindo que dípteros possuem outro mecanismo, ainda desconhecido, envolvido na ativação de HR. A NHEJ pode ocorrer em todas as fases do ciclo celular, sendo preferencial em G1. A proteína TP53BP1 se associa a PAXIP1 e RIF1 para inibir a ressecção dos terminais e favorecer NHEJ. TP53BP1 se originou em Metazoa, enquanto PAXIP1 e RIF1 emergiram em eucariotos basais (ARCAS et al., 2014), e possuem ortólogos em A. *aegypti*. Testes *in vitro* com células HeLa demonstraram que o dano ao DNA pode induzir uma associação entre PAXIP1 e ARTEMIS. Essa interação ocorre posteriormente a TP53BP1 na via e promove cortes nas extremidades do DNA, evitando a extensa ressecção, facilitando NHEJ. Experimentos com células knockout para TP53BP1 e PAXIP1 demonstraram que a retenção de ARTEMIS na região do dano é dependente de ambas proteínas (WANG et al., 2014). Como somente ARTEMIS e PAXIP1 estão presentes em A. aegypti, pode-se especular que talvez apenas PAXIP1 seja suficiente para reter ARTEMIS nos sítios de dano e que o mecanismo funcione sem a presença de TP53BP1. De fato, PAXIP1 (AAEL025635-RA) e RIF1 (AAEL021836-RA-C) aumentaram a expressão em virtude do estresse oxidativo gerado pelo paraquat, sugerindo a participação de ambos na ativação de NHEJ.

A SUMO E3 ligase PIAS4 não foi identificada em *A. aegypti* e, também, não é encontrada em *D. melanogaster*. Em vertebrados, esta proteína, junto com a SUMO E3 ligase PIAS1, está envolvida na sumoilação de diversas proteínas de RDD, como HERC2, RNF168, BRCA1 e TP53BP1 (BEKKER-JENSEN; MAILAND, 2011; DANIELSEN et al., 2012; GALANTY et al., 2009). Como PIAS1 emergiu antes da divisão de plantas, e PIAS4 é encontrada apenas em vertebrados (ARCAS et al., 2014), PIAS1 deve cumprir o papel de PIAS4 nesses organismos.

Uma etapa importante na via de sinalização de DSB é a fosforilação de H2A/H2AX, por ATM, gerando γH2AX (CICCIA; ELLEDGE, 2010). A região de fosforilação consiste em um motivo conservado denominado SQ, sendo a Ser139 e Ser138 fosforiladas em humanos e no ortólogo funcional de *D. melanogaster* (H2Av), respectivamente (MADIGAN, 2002). Nas análises conduzidas no presente trabalho foi possível identificar, em *A. aegypti*, a sequência (AAEL012499-PA) contendo o motivo SQ (figura 31). Além disso, a predição de fosforilação, realizada pelo NetPhos, indicou a Ser134 como sítio de fosforilação de ATM em AAEL012499-PA. Dessa forma, os

resultados obtidos sugerem que AAEL012499-PA consiste em um ortólogo funcional de H2AX de humanos e de H2Av de *D. melanogaster*. A fosforilação de H2A/H2AX permite o recrutamento de MDC1, proteína envolvida na amplificação da cascata de sinalização (STUCKI et al., 2005). Arcas et al, 2014, sugeriu que MDC1 surgiu em vertebrados (ARCAS et al., 2014), entretanto *D. melanogaster* possui ortólogo funcional para essa proteína, e através das análises empregadas neste trabalho, foi possível também identificar ortólogo em *A. aegypti*. Dessa forma, MDC1 possivelmente tem origem anterior à vertebrados, sendo necessários mais estudos para confirmar sua presença em outros organismos.

De uma maneira geral, a expressão dos genes da via de sinalização de DSB aumentou em função do tratamento com paraquat (figura 31). Além disso, duas isoformas de RAD50 foram encontradas diferencialmente expressas, AAEL005245-RB com expressão proeminente em 24h (grupo 1), e AAEL025895-RA com aumento de expressão em 6h (grupo 4). RAD50 consiste em uma subunidade do complexo MRN, o qual está envolvido no reconhecimento de DSBs e na ativação de ATM, além de promover a ressecção inicial de DSB, em associação com CtIP, facilitando HR. Através das figuras 32 e 34, é possível observar que, apesar da ausência de suporte estatístico, os outros componentes de MRN apresentaram um perfil de expressão semelhante a RAD50. O aumento de expressão de RAD50 (AAEL005245-RB e AAEL025895-RA com suporte estatístico), MRE11 (AAEL023601-RA) e NBN (AAEL014377-RA e AAEL023570-RB), indica que o paraquat está causando quebras na dupla fita do DNA. Além disso, mesmo não estando diferencialmente expressos, a maioria dos genes envolvidos na cascata de sinalização de DSB aumentaram a expressão, sugerindo ativação desta via.

Após a sinalização de DSB o dano pode ser reparado por HR ou NHEJ. A HR ocorre nas fases S e G2 do ciclo celular e requer ressecção das extremidades de DSB, realizada inicialmente pela subunidade MRE11 do complexo MRN em associação a CtIP e BRCA1 (KREJCI et al., 2012). Em seguida, a ressecção extensa é mediada por EXO1 ou DNA2, em um processo facilitado por BLM ou WRN (CHEN et al., 2008; NIMONKAR et al., 2008, 2011; SARTORI et al., 2007; STURZENEGGER et al., 2014). Como discutido anteriormente, BRCA1 está ausente e CtIP não foi encontrada em *A. aegypti* e ainda não se sabe como este inseto lida com isso. EXO1, DNA2 e WRN emergiram em eucariotos basais, e BLM é encontrada em procariotos (ARCAS et al., 2014). *A. aegypti* possui ortólogo para as quatro proteínas, porém, ainda não se sabe como dito dito dite curve a participação inicial de CtIP. Como dito

anteriormente, duas isoformas de RAD50 foram encontradas diferencialmente expressas nos grupos 1 e 4, evidenciando a formação de DSB através do estresse oxidativo gerado pelo paraquat, e sua detecção pelo complexo MRN.

RAD51 é uma proteína conservada, encontrada em procariotos e em eucariotos, que desempenha um papel fundamental em HR através da formação dos filamentos de nucleoproteínas. Um ortólogo de RAD51 (AAEL006080-PA) foi encontrado em A. aegypti, evidenciando a conservação desta via neste inseto. BRCA2 e PALB2 medeiam a troca de RPA por RAD51 facilitando a formação dos nucleofilamentos, que são estabilizados pelos parálogos de RAD51. BRCA2 emergiu em eucariotos basais (ARCAS et al., 2014), estando presente em A. aegypti. Entretanto não foi encontrado ortólogo para PALB2, que surgiu apenas em vertebrados e encontra-se ausente também em D. melanogaster (ARCAS et al., 2014). Humanos possuem cinco parálogos de RAD51, sendo eles: RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 and XRCC3. Estes parálogos formam os complexos: BCDX2 (RAD51B-RAD51C- RAD51D-XRCC2) e CX3 (RAD51C-XRCC3) (SUWAKI; KLARE; TARSOUNAS, 2011). A. aegypti não possui ortólogo para RAD51B e XRCC2, indicando que este mosquito não é capaz de formar o complexo BCDX2. De fato, RAD51B está ausente em Ecdysozoa, porém, ortólogos de XRCC2 estão presentes em D. melanogaster e nos mosquitos A. gambiae e C. quinquefasciatus (KEGG orthology group K10879 – taxonomy link). A proteína RAD54, que auxilia na invasão da cromátide irmã, possui dois ortólogos em humanos (GOYAL et al., 2018; KIIANITSA; SOLINGER; HEYER, 2006). Ambas isoformas de RAD54 (RAD54B - AAEL002341-PB e RAD54L - AAEL002647-PA) foram encontradas em A. aegypti, apesar da isoforma RAD54B ter sido perdida em muitos insetos (SEKELSKY, 2017).

As DNA polimerases replicativas (POL  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ) ou de translesão (POL  $\eta$ ,  $\kappa$ ) estendem a fita do DNA gerando uma estrutura denominada D-loop (SEBESTA et al., 2013). As DNA polimerases replicativas POL  $\delta$  and  $\varepsilon$  são complexos, ambos compostos por quatro subunidades. A POL  $\delta$  é formada por uma subunidade catalítica POLD1 (p125) e três subunidades acessórias: POLD2 (p50), POLD3 (P66) e POLD4 (p12) Ortólogo para POLD4 não foi identificado em *A. aegypti*, e já foi demonstrado que insetos não possuem ortólogo para esta subunidade (ZHANG et al., 2016). Além disso, estudos indicaram que, em humanos, a subunidade POLD4 é degradada em resposta ao dano ao DNA, convertendo o heterotetrâmero em um heterotrímero, denominado POL $\delta$ 3. Acredita-se que POLD4 seja uma subunidade regulatória de POL $\delta$ . De fato, POL $\delta$ 3 apresenta
propriedades distintas a POL $\delta$ , impactando na manutenção da integridade genômica, replicação celular e no reparo ao DNA. Dessa forma, em *A. aegypti*, POL  $\delta$  deve possuir sua função conservada mesmo com a ausência da subunidade POLD4. Em relação as DNA polimerases de translesão, apenas POL  $\eta$  foi identificada em *A. aegypti*. A POL  $\kappa$  não foi encontrada, estando ausente também em *D. melanogaster* e em diversos insetos (SEKELSKY, 2017).

A DSB pode ser reparada por uma via independente de RAD51, denominada anelamento de fita simples (SSA). O reparo por SSA é mediado pela proteína RAD52, que não foi encontrada em *A. aegypti* e, também, não possui ortólogo em *D. melanogaster* (SEKELSKY, 2017). Experimentos conduzidos em células MCF-7 demonstraram que a depleção de RAD52 é sinteticamente letal em células deficientes em BRCA1 ou PALB2 (LOK et al., 2013). Como já discutido neste trabalho, *A. aegypti* e *D. melanogaster* também não possuem ortólogos para BRCA1 e PALB2, e ainda não se sabe como dípteros lidam com essas perdas (SEKELSKY, 2017). Todavia, apesar da ausência de RAD52, SSA ocorre normalmente em *D. melanogaster*, e em *A. aegypti*, sugerindo que outras proteínas desempenham o papel de RAD52 nestes insetos.

Foi possível observar aumento de expressão da maioria dos genes que participam de HR (figura 34). Entre os genes que aumentam a expressão, com suporte estatístico, estão as subunidades POLD2 (AAEL007141-RA) e POLE2 (AAEL002785-RA) das polimerases replicativas POLδ e POLε (grupo 1); a subunidade do RFC1 (AAEL001324-RB) complexo RFC (grupo 4); e duas isoformas de RAD50 (grupo 1 e grupo 4) (figura 33A). Entretanto, como estes genes participam de outras vias de reparo, o aumento de expressão deles não pode ser atribuído apenas a ativação de HR. Como RFC1 codifica uma importante proteína de RDD, que está envolvida em diversas vias de reparo, o qPCR foi feito para validar a alteração de expressão. Apesar de ambas técnicas indicarem aumento de expressão de RFC1 em função do paraquat, o RNAseq sugeriu uma elevação na transcrição em 6h seguido de uma redução em 12h e 24h, enquanto, o qPCR mostrou um aumento de expressão com suporte estatístico para 24h (figura 43G). O perfil encontrado no qPCR condiz mais com a função de RFC1.

Além disso, a subunidade MCM2 (AAEL007007-RA), do complexo MCM, foi encontrada diferencialmente expressa (grupo 1). O complexo MCM consiste em uma DNA helicase essencial para a replicação do DNA genômico. Este complexo também está envolvido com o reparo de DSB através da sub via de HR, BIR. Um estudo com extrato de ovos de *Xenopus* mostrou que a subunidade MCM2 é fosforilada por ATM e ATR, em Ser92, em resposta ao bloqueio da replicação e DSB (HAE et al., 2004). Dessa forma, o aumento de expressão de MCM2, com suporte estatístico, indica ativação de BIR.

A NHEJ consiste na principal via de reparo de DSB em eucariotos, e ortólogos para a maioria das proteínas desta via foram encontrados em *A. aegypti*. As proteínas do completo Ku, KU70 e KU80, bem como a quinase DNAPKcs se originaram em eucariotos basais (ARCAS et al., 2014) e ortólogos foram encontrados em *A. aegypti*. Entretanto, curiosamente, DNAPKcs está "ausente" em *D. melanogaster* e em vários insetos (SEKELSKY, 2017). A endonuclease ARTEMIS, responsável por processar a DSB para encontrar nucleotídeos complementares, está ausente em *D. melanogaster* e já foi sugerido que dípteros perderam este gene (SEKELSKY, 2017). Entretanto, um ortólogo de ARTEMIS (AAEL026758-PA) foi encontrado em *A. aegypti*, derrubando a hipótese de que dípteros não possuem ARTEMIS. Em *A. aegypti*, também foi possível encontrar ortólogo para APLF (AAEL011254-PA-H).

As DNA polimerases da família X atuam no processamento das extremidades de DSB, inserindo nucleotídeos para preencher pequenos *gaps*. POL  $\mu$ , POL  $\lambda$  fazem parte desta família e são capazes de inserir nucleotídeos de maneira dependente ou independente de um molde. Outros membros desta família são a POL  $\beta$ , que não possui o domínio BRCT que medeia a interação com o complexo Ku (CHANG et al., 2017) e TDT que é majoritariamente expresso em linfócitos (humanos) estando envolvido na recombinação V(D)J (MOTEA; BERDIS, 2010). Em *A. aegypti*, não foram encontrados ortólogos para as polimerases da família X, sugerindo que o processamento das extremidades ocorra sem a inserção de nucleotídeos. Como outras polimerases podem inserir nucleotídeos de maneira dependente de um molde, também é possível que seja função esteja sendo realizada por outra polimerase (CHANG et al., 2017). Ademais, as polimerases da família X estão ausentes na maioria dos insetos, incluindo *D. melanogaster* (SEKELSKY, 2017).

O complexo que catalisa a ligação das extremidades em NHEJ é formado por XLF, XRCC4 e LIG4. Apesar de ter emergido antes da divisão de plantas, e possuir ortólogos em *D. melanogaster* e em vários dípteros (ARCAS et al., 2014; GORSKI et al., 2003; SEKELSKY, 2017), XRCC4 não foi encontrada em *A. aegypti* neste estudo. Em ratos, o *knockout* de XRCC4 reduz em 20 vezes a via de NHEJ, induzindo a degradação dos terminais e o reparo por micro homologia (SCHULTE-UENTROP et al., 2008). Como XRCC4 consiste em uma importante proteína de NHEJ, mais estudos são necessários para determinar como a etapa de ligação em NHEJ ocorre na ausência de

Os genes envolvidos em NHEJ, KU80 (AAEL003684-RA) e LIG4 (AAEL021495-RA), estão diferencialmente expressos, observando um aumento de expressão semelhante ao perfil do grupo 1 (figura 36). KU80 participa do complexo Ku, que se liga as extremidades das fitas danificadas, protegendo a região da ação das exonucleases (IYAMA; WILSON, 2013). LIG4, em associação com XRCC4 e XLF, catalisa a ligação do DNA, finalizando o reparo. Além disso, duas isoformas da nuclease APLF (AAEL011254-RA/B), também foram encontradas diferencialmente expressas com aumento de expressão em 24h (grupo 1). APLF está envolvida com o reparo de SSBs e DSBs, e em associação com PARP3, promove a retenção de LIG4-XRCC4 na cromatina acelerando a etapa de ligação do DNA (RULTEN et al., 2011). Além disso, PARP recruta a proteína de ancoragem XRCC1, que é capaz de interagir com APLF (HNÍZDA; BLUNDELL, 2019). PARP1 (AAEL011815-RA) e XRCC1 (AAEL002782-RB) também foram encontradas diferencialmente expressas (vide figura 40 de BER). Dessa forma, o aumento de expressão, com suporte estatístico, de KU80 (AAEL003684-RA), LIG4 (AAEL021495-RA), APLF (AAEL011254-RA/B), PARP1 (AAEL011815-RA) e XRCC1 (AAEL002782-RB) sugere, que NHEJ está sendo ativada em resposta ao tratamento com paraquat. Apesar da ausência de suporte estatístico para KU70 (AAEL019404-RA/B), ARTEMIS (AAEL026758-RA), DNAPKcs (AAEL024736-RA) e XLF (AAEL021206-RA), é possível observar o aumento de expressão dessas proteínas em função do estresse oxidativo gerado pelo paraquat, reforçando a hipótese de ativação de NHEJ. Os resultados também indicam que NHEJ é funcional em A. aegypti, mesmo com a ausência de XRCC4, levantando a hipótese de que este inseto possui um ortólogo funcional desta proteína que ainda não foi possível de ser identificado.

Danos a fita simples como bases oxidadas, dímeros de pirimidina e mal pareamento de bases, são corrigidos pelas vias de reparo por excisão de base (BER), nucleotídeo (NER) e erro de mal pareamento (MMR). De uma maneira geral os mecanismos destas vias podem ser divididos em: detecção do dano, processamento do dano, síntese de nucleotídeos e ligação. O que difere uma via da outra é a maquinaria enzimática utilizada por cada uma. A MMR é uma via evolutivamente conservada, sendo orquestrada, em eucariotos, por homólogos das proteínas procarióticas (MutS MSH2, MSH3 e MSH6) e MutL (MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2) (GROOTHUIZEN; SIXMA, 2016). Em *A. aegypti*, não foram encontrados ortólogos das proteínas MSH3, MLH3 e PMS1, os quais também não estão presentes em *D. melanogaster* e parecem terem sido perdidos em dípteros (SEKELSKY, 2017). O homólogo de MutS, MSH3, interage com MSH2 para formar o complexo MutS $\beta$ , envolvido na detecção de inserções e deleções contendo mais de duas bases. Como dípteros não possuem MSH3, possivelmente, eles conseguem formar apenas o complexo MutS $\alpha$  e ainda não se sabe se inserções e deleções com mais de duas bases são reparadas nestes insetos por esta via. A ausência de MLH3 e PMS1 pode não ser prejudicial a estes insetos, uma vez que o complexo MutL $\alpha$  (MLH1-PMS2) é o principal envolvido em MMR (ERIE; WENINGER, 2014; WESSBECHER; BRIEGER, 2018).

Apesar do aumento de expressão dos genes de MMR, nenhum gene específico desta via foi encontrado diferencialmente expresso, apenas RPA1 (AAEL012826-RA) e RFC1 (AAEL001324-RB) que participam de outras vias de reparo. Os danos reparados por MMR ocorrem durante a replicação e são aqueles que escapam da detecção pela DNA polimerase, como bases mal pareadas e loops causados por pequenas inserções ou deleções (HSIEH; YAMANE, 2008; IYAMA; WILSON, 2013). Entretanto, apesar da ausência de suporte estatístico não é possível afirmar que MMR não é ativada mediante ao tratamento com paraquat, uma vez que é possível observar alteração de expressão da maioria dos genes. Além disso, observando o perfil de expressão de MSH2 (AAEL027688-RA), MLH1 (AAEL005858-RA) e PMS2 (AAEL026487-RA) é possível observar uma resposta tardia, iniciando em 12h e 24h, sugerindo que MMR não é a primeira escolha para reparar danos oxidativos, mas que é ativada em virtude do acúmulo de danos.

Em BER, a detecção do dano ocorre através de DNA glicosilases que podem ser mono ou bifuncionais. Humanos possuem onze glicosilases, entretanto em *A. aegypti* só foram encontradas três: SMUG (AAEL013286-PC), OGG (AAEL013179-PA, AAEL008148-PA/B) e NTH (AAEL003906-PA). As glicosilases monofuncionais UNG, MUTY e MPG estão ausentes em dípteros e MBD4 está presente apenas em algumas espécies dessa ordem, como *D. melanogaster*. A ausência de UNG (a principal uracil DNA glicosilase) em *D. melanogaster*, e a regulação negativa de desoxiuracil trifosfatase (dUTase) já foram correlacionadas com altos níveis de incorporação de uracil no DNA de larvas. Em larvas de *D. melanogaster* altos níveis de DNA contendo uracil são bem tolerados, entretanto corrigidos durante o desenvolvimento (MUHA et al., 2012; SEKELSKY, 2017). De fato, *D. melanogaster* possui uma proteína denominada *degrading factor* (UDE) capaz de degradar DNA contendo uracil (BÉKÉSI et al., 2007). Essa proteína está presente em insetos holometábolos, incluindo *A. aegypti*, indicando que este mosquito lida com uracil no DNA da mesma forma que *D. melanogaster*. A endonuclease APE atua após a DNA glicosilase, sendo responsável formar os terminais 5' desoxirribose fosfato (5'-dRP) e 3'-hidroxila (3'-OH) (CARTER; PARSONS, 2016). Humanos possuem duas isoformas da endonuclease APE, APE1 e APE2, todavia a literatura reporta que dípteros apresentam apenas um ortólogo para APE1 (SEKELSKY, 2017). De fato, nas análises realizadas neste trabalho apenas ortólogo de APE1 (AAEL010781-PA/B) foi identificado em *A. aegypti*.

A via curta de BER (SP-BER) requer a POL  $\beta$  e o complexo XRCC1-LIG3 para catalisar a síntese de nucleotídeos, e a ligação do DNA, respectivamente. Como discutido anteriormente, dípteros não possuem ortólogo de POL  $\beta$ , dessa forma, já foi sugerido que estes insetos utilizam apenas a via longa (LP-BER) (ARCAS et al., 2014). Além disso, *A. aegypti* não possui ortólogo de LIG3, apesar de ser encontrado em diversos dípteros, incluindo *D. melanogaster*, reforçando a hipótese de que este inseto utiliza apenas LP-BER. Entretanto, *A. aegypti* apresenta ortólogos para XRCC1 (AAEL002782-PB).

Como já citado, PARP é uma importante proteína na RDD, sendo responsável por promover o recrutamento de diversas proteínas de reparo, através do reconhecimento de regiões de SSB e DSB e da síntese de cadeias de polímeros de ADP-ribose (pAR). Em humanos os homólogos de PARP, PARP1 e PARP2, estão envolvidos em BER, entretanto, em *A. aegypti*, apenas ortólogo de PARP1 (AAEL011815-PA) foi encontrado em *A. aegypti*. Apesar de ambas possuírem funções específicas, alguns de seus papéis se sobrepõem (HANZLIKOVA et al., 2017; YELAMOS et al., 2011). Considerando que PARP2 está ausente em artrópodes (ARCAS et al., 2014) é possível que PARP1 desempenhe as funções de PARP2 nestes organismos.

Alguns genes envolvidos em BER foram encontrados diferencialmente expressos, sendo eles: PARP1 (AAEL011815-RA), XRCC1 (AAEL002782-RB), POLE2 (AAEL002785-RA), POLD2 (AAEL007541-RB), RFC1 (AAEL001324-RB) e RPA1 (AAEL012826-RA). Como já abordado anteriormente, POLE2, POLD2, RFC1 e RPA1 participam de outras vias, não sendo possível correlacionar o aumento na transcrição destes genes com apenas uma via de reparo. PARP1, como citado acima, reconhecem e se ligam a regiões de SSB e DSB, onde, após uma mudança estrutural, se ativam e iniciam a síntese de cadeias de polímeros de ADP-ribose (pAR). O acúmulo de pAR funciona como um sinal que leva ao recrutamento de XRCC1, que também foi encontrada

diferencialmente expressa (grupo 1). XRCC1 serve de ancoragem para o recrutamento de outras proteínas relacionadas ao reparo do DNA, como POL β e LIG3 (REYNOLDS et al., 2015; WEI et al., 2013). Todavia, como já discutido neste trabalho, não foi possível identificar ortólogos de POL β e LIG3 em A. *aegypti*, levando a crer que a SP-BER não é funcional neste mosquito. Entretanto, XRCC1 interage com outras proteínas envolvidas em BER e no reparo de SSB como: PNPK, APTX, APE e as DNA glicosilases, sugerindo reparo de bases oxidadas e SSB, e a consequente ativação de LP-BER. Além disso, o aumento da expressão de RAD9 (AAEL010759-RA) em 24h (vide sinalização de ATR, figura 28), com suporte estatístico, reforça a hipótese de ativação de LP-BER. Como dito anteriormente, RAD9 é um componente do complexo 9-1-1, que participa da via de sinalização de ATR, estando envolvido na ativação dos pontos de checagem do DNA. Entretanto, diversos estudos já sugeriram o envolvimento do complexo 9-1-1 com LP-BER, através da interação com diversas proteínas dessa via. O complexo 9-1-1 é capaz de se ligar e aumentar a atividade de APE, FEN1, POL  $\beta$ , LIG1 e das glicosilases MUTY, NEIL1, TDG e OGG, estimulando LP-BER (HWANG et al., 2015; PARK et al., 2009; SMIRNOVA et al., 2005; TOUEILLE et al., 2004; WANG et al., 2004). Dessa forma, o aumento de expressão da maioria dos genes de BER e de PARP1 (AAEL011815-RA), RAD9 (AAEL010759-RA), XRCC1 (AAEL002782-RB), além de POLE2 (AAEL002785-RA), POLD2 (AAEL007541-RB), RFC1 (AAEL001324-RB) e RPA1 (AAEL012826-RA), com suporte estatístico, indica participação desta via na correção de danos oxidativos gerados pelo paraquat. Ademais, as alterações de expressão de PARP1 e XRCC1 foram validadas através do qPCR.

Em NER a detecção do dano pode ocorrer pelo reparo do genoma global (GG-NER) ou pelo reparo acoplado à transcrição (TC-NER). Em GG-NER a detecção ocorre através da ligação do complexo XPC a fita não danificada, e do complexo UV-DDB que auxilia na retenção das proteínas ao redor do dano. A subunidade do complexo XPC, CENT2 não foi identificada em *A. aegypti*, estando ausente também em *D. melanogaster*. No entanto, apesar de CENT2 aumentar a atividade de XPC-HR23B, não é essencial para NER (NISHI et al., 2005), sugerindo que a ausência de ortólogo para essa proteína em *A. aegypti* não deve afetar GG-NER. Além disso, o complexo XPC é capaz de reconhecer o dano na ausência do complexo UV-DDB (OH et al., 2011), dessa forma, a inexistência da subunidade DDB2, em *A. aegypti*, não deve inviabilizar GG-NER.

Em TC-NER, o bloqueio da RNA polimerase II por lesões que distorcem a estrutura do DNA, recruta as proteínas CSA e CSB. Ambas não foram encontradas em *A*.

*aegypti* e parecem ter sido perdidas em dípteros (CSA está ausente também em holometábolos) (SEKELSKY, 2017). Em humanos, mutações em CSA e CSB acarretam a Síndrome de Cockayne, uma doença autossômica recessiva, caracterizada por microcefalia, fotossensibilidade, envelhecimento precoce, baixa estatura e atraso de aprendizagem e desenvolvimento (KARIKKINETH et al., 2017). Apesar do prejuízo causado pela mutação destes genes em humanos, evidências da funcionalidade de TC-NER não foram identificadas em *D. melanogaster* (SEKELSKY, 2017), e ainda não se sabe como dípteros lidam com estas perdas.

As outras proteínas que participam de NER, com exceção de LIG3, foram encontradas em *A. aegypti*, sugerindo que GG-NER seja funcional neste inseto.

Em NER foram encontrados diferencialmente expressos XPC (AAEL018259-RB), HR23B (AAEL002077-RA) e XPB (AAEL013205-RA). O aumento de expressão de XPC e HR23B indica ativação de GG-NER. O complexo XPC também é responsável pelo recrutamento de TFIIH (FAGBEMI; ORELLI; SCHÄRER, 2011), complexo ao qual pertence a helicase XPB. Juntamente com XPD, XPB é responsável pela abertura da dupla fita de DNA em torno da lesão, o que permite o recrutamento de outros fatores, como por exemplo o complexo RPA (FUSS; TAINER, 2011). Outros genes que participam de NER também foram encontrados diferencialmente, sendo eles: RPA1 (AAEL012826-RA), RCF1 (AAEL001324-RB), POLE2 (AAEL002785-RA), POLD2 (AAEL007541-RB) e XRCC1 (AAEL002782-RB).

Para confirmar as alterações de expressão com suporte estatístico qPCR foi feito para os genes XPC e XPB. O aumento de expressão de XPC foi validado, entretanto, a expressão de XPB não variou no qPCR. Todavia, a ausência de variação na expressão de XPB não invalida a hipótese de ativação de NER mediante ao tratamento com paraquat.

Como discutido anteriormente, o paraquat é um agente pró oxidante, e gerou modificações transcricionais nas larvas, diminuindo o metabolismo energético e aumentando a expressão de genes relacionados a processo de detoxificação e reparo.

De uma maneira geral, foi possível observar aumento de expressão da maioria dos genes envolvidos nas vias de reparo, sugerindo que os danos oxidativos gerados pelo paraquat estão sendo reconhecidos e reparados pelos mecanismos da RDD. Além disso, genes de RDD foram encontrados diferencialmente expressos, evidenciando a ativação destas vias. Como já abordado, o aumento na transcrição, com suporte estatístico, de duas isoformas de RAD50 evidencia a presença e detecção de DSBs. Os genes de HR e NHEJ apresentaram aumento de expressão em virtude do tratamento com paraquat, sugerindo ativação de ambas as vias. Todavia, KU80, APLF e LIG4, genes que desempenham papel crucial em NHEJ, foram encontrados diferencialmente expressos, indicando que NHEJ é a via preferencial para reparo de DSBs, dado que condiz com a literatura.

Danos oxidativos como SSBs e oxidação de bases nitrogenadas são, majoritariamente, reparados por BER. De fato, foi possível observar aumento de expressão dos genes de BER, apesar de nenhuma glicosilase ter sido encontrada diferencialmente expressa. Entretanto, o aumento de expressão dos genes específicos de NER, XPC, HR23B e XPB, sugere que NER está sendo ativada em função do tratamento com paraquat, apesar desta via não estar diretamente envolvida no reparo de lesões oxidativas. NER está relacionada com o reparo de lesões volumosas causadas por radiação ultravioleta, como dímeros de pirimidina. Dessa forma, os dados obtidos neste trabalho sugerem que tanto BER quanto NER estão envolvidas no reparo de danos oxidativos gerados pelo paraquat.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho a RDD foi estudada em larvas do mosquito *A. aegypti*, tratadas com 0,5 mM de paraquat durante 6h, 12h e 24h, através da metodologia de RNAseq. Foi possível concluir que este tratamento ocasionou alterações significativas em 1848 genes.

A análise de enriquecimento funcional dos resultados globais do transcriptoma permitiu concluir que o tratamento com paraquat acarretou no aumento da expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse, reparo de DSB, transcrição do DNA, metabolismo de aminoácidos, síntese de proteínas, autofagia da mitocôndria e transportadores ABC. Enquanto genes relacionados à respiração celular, fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons, síntese de ATP, ciclo do ácido cítrico, catabolismo de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, reduziram sua expressão em função do tratamento com paraquat.

Através do aumento da transcrição, com suporte estatístico, dos transportadores ABC, ferritina e DNAJ foi possível concluir que as larvas ativaram mecanismos de detoxificação para lidar com EROs gerados pelo paraquat. Além disso, o aumento da expressão de genes relacionados ao reparo demonstrou que as vias de reparo estão sendo acionadas para reparar os danos oxidativos provocados pelo paraquat.

Através do resultado do enriquecimento, também foi possível concluir que o tratamento com paraquat diminuiu o metabolismo energético nas larvas, através da redução da transcrição de genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Ademais, o aumento na expressão de genes relacionados a mitofagia indica uma tentativa das larvas em manter a homeostase através da eliminação das mitocôndrias danificadas pelo paraquat.

A ativação de genes envolvidos na transcrição, metabolismo de aminoácidos e proteínas permitiu concluir que o tratamento com paraquat induz uma resposta transcricional.

As análises de bioinformática, conduzidas neste trabalho, foram capazes de identificar, em *A. aegypti*, ortólogos para diversas proteínas cruciais para a RDD, como: RAD51, RAD50, MRE11, NBN, KU80, KU70, LIG4, XLF, XPA, XPC, XPB, XPD, XPE, XPF, XPG, MSH2, MSH6, PMS2, MLH1, SMUG, OGG and NTH. Além disso, foi possível encontrar o ortólogo funcional de H2AX humana (*Drosophila* H2Av), histona envolvida na RDD. Dessa forma, os resultados indicam que a sinalização de ATR e de DSB são funcionais neste inseto, bem como as vias de reparo HR, NHEJ, MMR, LP-BER e GG-NER.

Todavia, não foi possível identificar ortólogos para algumas proteínas de RDD, sendo elas: BRCA1 e seus parceiros do complexo BRCA1-A, TP53BP1, CtIP, DSS1, PALB2, XRCC2, SLX4, POLk, POLβ, XRCC4 e LIG3. Em humanos, praticamente todas são essenciais, afetando a sinalização de DSB, HR, NHEJ, GG-NER e SP-BER. As proteínas do complexo BRCA1-A e TP53BP1 estão ausentes também em dípteros, e ainda não se sabe como estes organismos lidam com a escolha entre HR e NHEJ. Entretanto, ambas são funcionais nestes insetos, sugerindo que exista outro mecanismo, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Apesar da ausência de XRCC4, NHEJ é funcional em *A. aegypti*, sugerindo que este inseto possui ortólogo de XRCC4 que ainda não foi encontrado. A ausência de CSA e CSB, em *A. aegypti* e dípteros, indica que a sub via GG-NER não é funcional nestes insetos, visto que são essenciais para o reconhecimento do dano em GG-NER. Dípteros também não possuem ortólogos das polimerases da família POLβ, além disso, não foi possível identificar LIG3 em *A. aegypti*. Uma vez que ambas são fundamentais para SP-BER, possivelmente esta sub via de BER não é funcional em *A. aegypti*.

Os perfis de expressão dos genes de RDD encontrados mostraram que a maioria das vias estão sendo ativadas em função do estresse oxidativo gerado pelo paraquat. Além disso, genes de RDD foram encontrados diferencialmente expressos, reforçando a hipótese de ativação destas vias.

Através do aumento de expressão de MRE11, NBN e de duas isoformas de RAD50 (com suporte estatístico) pode-se concluir que o tratamento com paraquat ocasionou DSBs, as quais estão sendo detectadas pelo complexo MRN, ativando a cascata de sinalização de DSB. Ademais, o aumento na transcrição dos genes de NHEJ, incluindo KU80, APLF e LIG4 com suporte estatístico, levou à conclusão de que NHEJ, como esperado, é a via de escolha para reparo de DSBs em *A. aegypti*.

O aumento na transcrição de RAD9, com suporte estatístico, indicou que a via de sinalização de ATR está sendo ativada em virtude do estresse oxidativo gerado pelo paraquat. Entretanto, a redução na expressão de TOPBP1 sugeriu o oposto. Porém, o qPCR de TOPBP1 apresentou um perfil de expressão distinto ao RNAseq, mostrando um aumento da transcrição de TOPBP1 em 6h e 12h. Dessa forma, foi possível concluir que a via de ATR possivelmente está sendo ativada em virtude do paraquat.

RAD9 também desempenha importante função em BER, sendo capaz de se ligar e aumentar a atividade de diversos componentes de BER. Dessa forma, junto com o aumento de expressão de PARP1 e XRCC1, dois fatores cruciais em BER, foi possível concluir que esta via está sendo ativada para reparar lesões oxidativas geradas pelo paraquat.

Através do aumento de expressão de XPC, HR23B e XPA, com suporte estatístico, foi possível concluir que NER está sendo ativada para correção de danos oxidativos gerados pelo paraquat.

A ausência de genes específicos de MMR diferencialmente expressos não permite concluir que esta via está sendo ativada. Porém, o aumento da transcrição dos genes desta via nas larvas tratadas durante 12h e 24h sugere ativação de MMR em condições de acúmulo de danos.

Dessa forma, tendo em vista os resultados obtidos, o presente trabalho forneceu uma visão inicial geral de RDD em *A. aegypti*. Entender a RDD neste mosquito pode contribuir para os estudos da biologia de *A. aegypti*, bem como auxiliar no estabelecimento de técnicas de manipulação genética.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## ABBOTTS, R.; WILSON, D. M. Coordination of DNA single strand break repairFree Radical Biology and Medicine, 2017.

AHEL, I. et al. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. **Nature**, 2006.

ALBUQUERQUE, M. DE F. P. M. DE et al. Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. **Cadernos de Saúde Pública**, 2018.

ALONSO-PALOMARES, L. A. et al. Molecular Basis for Arbovirus Transmission by Aedes aegypti MosquitoesIntervirology, 2019.

ALTENHOFF, A. M.; DESSIMOZ, C. Phylogenetic and functional assessment of orthologs inference projects and methods. **PLoS Computational Biology**, 2009. ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.

**Babraham Bioinformatics**, p. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/, 2010.

APARICIO, T.; BAER, R.; GAUTIER, J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. **DNA Repair**, 2014.

ARCAS, A. et al. Emergence and evolutionary analysis of the human DDR network: Implications in comparative genomics and downstream analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 4, p. 940–961, 2014.

ARROYO-ÁVILA, M.; VILÁ, L. M. Rheumatic Manifestations in Patients with Chikungunya Infection. **Puerto Rico health sciences journal**, 2015.

ARYAN, A. et al. Germline excision of transgenes in Aedes aegypti by homing endonucleases. **Scientific Reports**, 2013a.

ARYAN, A. et al. TALEN-Based Gene Disruption in the Dengue Vector Aedes aegypti. **PLoS ONE**, 2013b.

ARYAN, A.; MYLES, K. M.; ADELMAN, Z. N. Targeted genome editing in Aedes aegypti using TALENs. **Methods**, 2014.

AWASTHI, P.; FOIANI, M.; KUMAR, A. ATM and ATR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, 2016.

AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C.

Chikungunya risk for BrazilRevista de Saude Publica, 2015.

BA, X.; BOLDOGH, LSTVAN. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesionsRedox Biology, 2018.

BARBER, L. J. et al. RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. **Cell**, 2008.

BASU, S. et al. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015.

BÉKÉSI, A. et al. A novel fruitfly protein under developmental control degrades uracil-DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 3, p. 643– 648, 2007.

BEKKER-JENSEN, S.; MAILAND, N. The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaksFEBS Letters, 2011.

BELCHER, J. D. et al. Heme degradation and vascular injury. Antioxidants & redox signaling, v. 12, n. 2, p. 233–248, 2010.

BHARGAVA, R.; ONYANGO, D. O.; STARK, J. M. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome MaintenanceTrends in Genetics, 2016.

BLACKFORD, A. N.; JACKSON, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage ResponseMolecular Cell, 2017.

BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequenceProteomics, 2004.

BONFIGLIO, J. J. et al. Serine ADP-Ribosylation Depends on HPF1. **Molecular Cell**, 2017.

BOTTINO-ROJAS, V. et al. Heme signaling impacts global gene expression, immunity and dengue virus infectivity in Aedes aegypti. **PLoS ONE**, 2015.

BROOKS, S. C. et al. Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylasesBiochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 2013.

BUISSON, R. et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2010.

CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. **Nature reviews.** Genetics, v. 9, n. august, p. 619–631, 2008.

CAMBINDO BOTTO, A. E.; MUÑOZ, J. C.; MUÑOZ, M. J. Coupling between nucleotide excision repair and gene expression. **RNA Biology**, 2018.

CARTER, R. J.; PARSONS, J. L. Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications. **Molecular and Cellular Biology**, 2016.

CDC. Yellow Fever in Brazil.

CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair Pathway Choices

and Consequences at the Double-Strand BreakTrends in Cell Biology, 2016.

CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. Origins of Programmable Nucleases for Genome EngineeringJournal of Molecular Biology, 2016.

CHANG, H. H. Y. et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repairNature Reviews Molecular Cell Biology, 2017.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesisEnvironmental and Molecular Mutagenesis, 2017.

CHEN, L. et al. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1·CtIP·MRN is important for DNA double-strand break repair. **Journal of Biological Chemistry**, 2008. CHEN, Q. et al. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress. **NeuroToxicology**, 2010.

CHOJNACKI, S. et al. Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. Nucleic Acids Research, 2017.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 2010.

CLEMONS, A. et al. Aedes aegypti: An emerging model for vector mosquito

development. Cold Spring Harbor Protocols, v. 5, n. 10, 2010.

COMPE, E.; EGLY, J.-M. Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, 2016.

COSTER, G.; GOLDBERG, M. The cellular response to DNA damage: A focus on MDC1 and its interacting proteins. **Nucleus**, v. 1, n. 2, p. 166–178, 2010.

DANIELSEN, J. R. et al. DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger. **Journal of Cell Biology**, 2012. DAVIS, A. J.; CHEN, B. P. C.; CHEN, D. J. DNA-PK: A dynamic enzyme in a

versatile DSB repair pathway. DNA Repair, 2014.

DEGENNARO, M. et al. Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. **Nature**, 2013.

DIAZ-ALBITER, H. et al. Reactive oxygen species-mediated immunity against Leishmania mexicana and Serratia marcescens in the phlebotomine sand fly Lutzomyia longipalpis. **Journal of Biological Chemistry**, 2012.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M.; HOEIJMAKERS, J. H. J. **Premature aging and** cancer in nucleotide excision repair-disordersDNA Repair, 2011.

DIZDAROGLU, M.; COSKUN, E.; JARUGA, P. Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kineticsMutation Research - Reviews in Mutation Research, 2017.

DOIL, C. et al. RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 435– 446, 2009.

DRAY, E. et al. Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. Nature Structural and Molecular Biology, 2010.

EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1998.

ERIE, D. A.; WENINGER, K. R. Single molecule studies of DNA mismatch repair. **DNA Repair**, v. 20, p. 71–81, 2014.

ESCRIBANO-DÍAZ, C. et al. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. **Molecular Cell**, v. 49, n. 5, p. 872–883, 2013.

FAGBEMI, A. F.; ORELLI, B.; SCHÄRER, O. D. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repairDNA Repair, 2011.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, 2016.

FATTAH, F. et al. Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. **PLoS genetics**, v. 6, n. 2, p. e1000855, 2010.

FRIEDHOFF, P.; LI, P.; GOTTHARDT, J. Protein-protein interactions in DNA mismatch repairDNA Repair, 2016.

FRIT, P. et al. Plugged into the Ku-DNA hub: The NHEJ networkProgress in Biophysics and Molecular Biology, 2019.

FUKUSHIMA, T. et al. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. **Environmental health** and preventive medicine, v. 7, n. 3, p. 89–94, 2002.

FUSS, J. O.; TAINER, J. A. **XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA** duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinaseDNA Repair, 2011.

GALANTY, Y. et al. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. **Nature**, 2009.

GAWARAMMANA, I. B.; BUCKLEY, N. A. Medical management of paraquat

ingestion. British Journal of Clinical Pharmacology, v. 72, n. 5, p. 745-757, 2011.

GEORGAKOPOULOS, N. D.; WELLS, G.; CAMPANELLA, M. The

pharmacological regulation of cellular mitophagyNature Chemical Biology, 2017.
GIBBS-SEYMOUR, I. et al. HPF1/C4orf27 Is a PARP-1-Interacting Protein that
Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity. Molecular Cell, 2016.
GILLES, A. F.; AVEROF, M. Functional genetics for all: Engineered nucleases,
CRISPR and the gene editing revolution. EvoDevo, 2014.
GIRARDOT, F.; MONNIER, V.; TRICOIRE, H. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult drosophila melanogaster. BMC Genomics, 2004.
GÓMEZ-HERREROS, F. et al. TDP2-Dependent Non-Homologous End-Joining
Protects against Topoisomerase II-Induced DNA Breaks and Genome Instability in
Cells and In Vivo. PLoS Genetics, 2013.

GORSKI, M. M. et al. The Drosophila melanogaster DNA Ligase IV Gene Plays a Crucial Role in the Repair of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks and Acts Synergistically with Rad54. **Genetics**, 2003.

GOYAL, N. et al. RAD54 N-terminal domain is a DNA sensor that couples ATP hydrolysis with branch migration of Holliday junctions. **Nature Communications**, 2018.

GRAÇA-SOUZA, A. V. et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 322–335, 2006. GRIMME, J. M. et al. Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. **Nucleic Acids Research**, 2010. GROOTHUIZEN, F. S.; SIXMA, T. K. **The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structuresDNA Repair**, 2016.

GRUNDY, G. J. et al. APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. **EMBO Journal**, 2013.

HAE, Y. Y. et al. Mcm2 is a direct substrate of ATM and ATR during DNA damage and DNA replication checkpoint responses. **Journal of Biological Chemistry**, 2004. HANZLIKOVA, H. et al. Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. **Nucleic Acids Research**, 2017.

HELLEDAY, T. et al. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. **DNA Repair**, v. 6, p. 923–935, 2007.

HEO, J. et al. TDP1 promotes assembly of non-homologous end joining protein

complexes on DNA. DNA Repair, 2015.

HNÍZDA, A.; BLUNDELL, T. L. Multicomponent assemblies in DNA-doublestrand break repair by NHEJCurrent Opinion in Structural Biology, 2019.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Acute exposure of drosophila melanogaster to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2013.

HSIEH, P.; YAMANE, K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 391–407, 2008.

HUEN, M. S. Y. et al. RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone

Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly. Cell, v. 131, n. 5, p. 901–914, 2007.

HWANG, B. J. et al. Association of the Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint clamp with MYH DNA glycosylase and DNA. **DNA Repair**, 2015.

ILES, N. et al. APLF (C2orf13) Is a Novel Human Protein Involved in the Cellular Response to Chromosomal DNA Strand Breaks. **Molecular and Cellular Biology**, 2007.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, v. 12, p. 620–636, 2013.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–8, 2009.

JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyondChromosoma, 2012.

JEPPESEN, D. K.; BOHR, V. A.; STEVNSNER, T. **DNA repair deficiency in neurodegenerationProgress in Neurobiology**, 2011.

JETTE, N.; LEES-MILLER, S. P. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosisProgress in Biophysics and Molecular Biology, 2015.

KARIKKINETH, A. C. et al. Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathwaysAgeing Research Reviews, 2017.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. Journal of Immunology Research, 2016.

KHUTORNENKO, A. A. et al. Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2010. KIIANITSA, K.; SOLINGER, J. A.; HEYER, W.-D. Terminal association of Rad54 protein with the Rad51-dsDNA filament. **Proceedings of the National Academy of**  Sciences of the United States of America, 2006.

KIM, Y.-J.; WILSON, D. M. Overview of base excision repair biochemistry. **Current molecular pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 3–13, 2012.

KISTLER, K. E.; VOSSHALL, L. B.; MATTHEWS, B. J. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito aedes aegypti. **Cell Reports**, 2015.

KREJCI, L. et al. Homologous recombination and its regulationNucleic Acids Research, 2012.

KRYSTON, T. B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human

carcinogenesis. Mutation research, v. 711, n. 1–2, p. 193–201, 2011.

KUMAGAI, A. et al. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 943–955, 2006.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LAVIN, M. F. et al. **ATM-dependent phosphorylation of all three members of the MRN complex: From sensor to adaptorBiomolecules**, 2015.

LEE, J. H. et al. Ferritin binds and activates p53 under oxidative stress. **Biochemical** and **Biophysical Research Communications**, 2009.

LIBERTI, S. E. et al. Bi-directional routing of DNA mismatch repair protein human exonuclease 1 to replication foci and DNA double strand breaks. **DNA Repair**, 2011. LIEBER, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. **Molecular Microbiology**, n. 3, p. 181– 211, 2011.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saúde Pública**, 2016.

LIMA, V. L. A et al. The antioxidant role of xanthurenic acid in the Aedes aegypti midgut during digestion of a blood meal. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–8, 2012.

LIU, D.; KEIJZERS, G.; RASMUSSEN, L. J. **DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cellsMutation Research - Reviews in Mutation Research**, 2017. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOK, B. H. et al. RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. **Oncogene**, 2013.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014. MA, S. et al. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in Bombyx mori. **Scientific reports**, v. 4, p. 4489, 2014. MACHARIA, R. W.; OMBURA, F. L.; AROKO, E. O. Insects' RNA profiling reveals absence of "hidden break" in 28S ribosomal RNA molecule of onion thrips, thrips tabaci. **Journal of Nucleic Acids**, 2015.

MADIGAN, J. P. DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. **Nucleic Acids Research**, 2002.

MALKOVA, A. Break-Induced Replication: The Where, The Why, and The HowTrends in Genetics, 2018.

MARKKANEN, E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damageDNA Repair, 2017.

MARTEIJN, J. A et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 465–481, 2014.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011.

MATOS, J.; WEST, S. C. Holliday junction resolution: Regulation in space and time. **DNA Repair**, 2014.

MCMENIMAN, C. J. et al. Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans. **Cell**, 2014.

MEEGAN, J. M. Yellow fever. In: Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B: Viral Zoonoses. [s.l: s.n.].

MI, H. et al. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 2019.

MLADENOV, E. et al. **DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and** its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulationSeminars in Cancer Biology, 2016.

MOLINA-CRUZ, A. et al. Reactive oxygen species modulate Anopheles gambiae immunity against bacteria and Plasmodium. **Journal of Biological Chemistry**, 2008. MORDES, D. A. et al. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. **Genes and Development**, v. 22, n. 11, p. 1478–1489, 2008.

MORETTI, M. L. et al. Transcription of putative tonoplast transporters in response to

glyphosate and paraquat stress in Conyza bonariensis and Conyza canadensis and selection of reference genes for qRT-PCR. **PLoS ONE**, 2017.

MOSCARIELLO, M. et al. Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. **DNA Repair**, 2015.

MOTA, M. B. DOS S. **VIAS DE REPARO DO DNA: aspectos evolutivos e o modelo Aedes aegypti**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015. MOTEA, E. A.; BERDIS, A. J. **Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymeraseBiochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2010.

MU, H. et al. Molecular basis for damage recognition and verification by XPC-RAD23B and TFIIH in nucleotide excision repairDNA Repair, 2018.

MUHA, V. et al. Uracil-containing DNA in Drosophila: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, 2012. MURAI, J. et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2012.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, 2014.

NICK MCELHINNY, S. A; KISSLING, G. E.; KUNKEL, T. A. Differential correction of lagging-strand replication errors made by DNA polymerases {alpha} and {delta}.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 49, p. 21070–21075, 2010.

NIMONKAR, A. V. et al. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008.

NIMONKAR, A. V. et al. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. **Genes and Development**, 2011.

NISHI, R. et al. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. TL - 25. **Molecular and cellular biology**, 2005.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, 2015.

OGI, T. et al. Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out

NER Repair Synthesis in Human Cells. Molecular Cell, 2010.

OH, J.; SYMINGTON, L. S. Role of the Mre11 complex in preserving genome integrityGenes, 2018.

OH, K. S. et al. Nucleotide excision repair proteins rapidly accumulate but fail to persist in human XP-E (DDB2 mutant) cells. **Photochemistry and Photobiology**, 2011. OLIVEIRA, J. H. M. et al. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of Aedes aegypti and allows proliferation of intestinal microbiota. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 3, 2011.

OVERCASH, J. M. et al. Understanding the DNA damage response in order to achieve desired gene editing outcomes in mosquitoes. **Chromosome Research**, 2015.

PAIVA-SILVA, G. O. et al. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. 2006.

PANIER, S.; BOULTON, S. J. Double-strand break repair: **53BP1** comes into focusNature Reviews Molecular Cell Biology, 2014.

PANNUNZIO, N. R.; WATANABE, G.; LIEBER, M. R. Nonhomologous DNA endjoining for repair of DNA double-strand breaksJournal of Biological Chemistry, 2018.

PARK, M. J. et al. Repair activities of human 8-oxoguanine DNA glycosylase are stimulated by the interaction with human checkpoint sensor Rad9-Rad1-Hus1 complex. **DNA Repair**, 2009.

PATRO, R. et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature Methods**, v. 14, n. 4, p. 417–419, 2017.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. Sublethal metal stress response of larvae of Aedes aegypti. **Physiological Entomology**, v. 39, n. 2, p. 111–119, 2014.

PLUCIENNIK, A. et al. PCNA function in the activation and strand direction of MutLα endonuclease in mismatch repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 16066–16071, 2010.

POWELL, J. R. Perspective piece mosquito-borne human viral diseases: Why aedes aegypti?American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2018.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. R: a Language and

**Environment for Statistical Computing.** [s.l: s.n.].

RAPPAS, M.; OLIVER, A. W.; PEARL, L. H. Structure and function of the Rad9binding region of the DNA-damage checkpoint adaptor TopBP1. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 313–324, 2011. REYNOLDS, P. et al. Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 8, p. 4028–4038, 2015. RODGERS, K.; MCVEY, M. **Error-Prone Repair of DNA Double-Strand BreaksJournal of Cellular Physiology**, 2016.

RONG, Y. S.; GOLIC, K. G. The Homologous Chromosome is an Effective Template for the Repair of Mitotic DNA Double-Strand Breaks in Drosophila. **Genetics**, 2003. ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. **DNA damage and the balance between survival and death in cancer biologyNature Reviews Cancer**, 2016.

RULTEN, S. L. et al. PARP-3 and APLF function together to accelerate

nonhomologous end-joining. Molecular Cell, 2011.

RUNOWSKA, M. et al. Chikungunya virus: A rheumatologist's perspectiveClinical and Experimental Rheumatology, 2018.

RZEZNICZAK, T. Z. et al. Paraquat administration in Drosophila for use in metabolic studies of oxidative stress. **Analytical Biochemistry**, 2011.

SADRZADEH, S. M. H. et al. Hemoglobin. A biologic Fenton reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 259, n. 23, p. 14354–14356, 1984.

SAKOFSKY, C. J.; MALKOVA, A. Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequencesCritical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2017.

SAMAI, M. et al. Modulation of Antioxidant Enzyme Expression and Activity by Paraquat in Renal Epithelial NRK-52E Cells. **Sierra Leone Journal of Biomedical Research**, v. 2, n. 2, p. 103–114, 2011.

SARTORI, A. A. et al. Human CtIP promotes DNA end resection. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 509–514, 2007.

SAÚDE., M. D. S. F. N. DE. Dengue, Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor -Manual de Normas Técnicas. p. 75, 2001.

SCHELLENBERG, M. J.; TUMBALE, P. P.; WILLIAMS, R. S. Molecular

underpinnings of Aprataxin RNA/DNA deadenylase function and dysfunction in neurological diseaseProgress in Biophysics and Molecular Biology, 2015.

SCHULTE-UENTROP, L. et al. Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. **Nucleic Acids Research**, 2008.

SEBESTA, M. et al. Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. **DNA Repair**, 2013.

SEKELSKY, J. DNA repair in Drosophila: Mutagens, models, and missing genes. **Genetics**, v. 205, n. 2, p. 471–490, 2017.

SHAFIROVICH, V.; GEACINTOV, N. E. **Removal of oxidatively generated DNA damage by overlapping repair pathwaysFree Radical Biology and Medicine**, 2017. SHARAN, R.; MARON-KATZ, A.; SHAMIR, R. CLICK and EXPANDER: A system for clustering and visualizing gene expression data. **Bioinformatics**, 2003.

SIRBU, B. M.; CORTEZ, D. DNA damage response: Three levels of DNA repair regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2013.

SMIRNOVA, E. et al. The human checkpoint sensor and alternative DNA clamp Rad9– Rad1–Hus1 modulates the activity of DNA ligase I, a component of the long-patch base excision repair machinery. **Biochemical Journal**, 2005.

SPIVAK, G. Nucleotide excision repair in humansDNA Repair, 2015.

STAEVA-VIEIRA, E.; YOO, S.; LEHMANN, R. An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control. **EMBO Journal**, 2003.

STEWART, G. S. et al. The RIDDLE Syndrome Protein Mediates a Ubiquitin-Dependent Signaling Cascade at Sites of DNA Damage. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 420–434, 2009.

STUCKI, M. et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1213–1226, 2005. STURZENEGGER, A. et al. DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

SUN, J. et al. Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. **Journal of Biological Chemistry**, 2012.

SUWAKI, N.; KLARE, K.; TARSOUNAS, M. **RAD51** paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesisSeminars in Cell and Developmental Biology, 2011.

SVS/MS. Boletim Epidemiológico 04 - 01/2019: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil.**, 2019a. SVS/MS. Boletim Epidemiológico 08 - 03/2019: Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. **Secretaria de**  Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil., v. 50, 2019b.

TAKAHASHI, M.; OGINO, T.; BABA, K. Estimation of relative molecular length of

DNA by electrophoresis in agarose gel. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -

Nucleic Acids and Protein Synthesis, v. 174, n. 1, p. 183–187, 1969.

TAUIL, P. L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya.

Epidemiologia e Serviços de Saúde, 2014.

TAYLOR, M. R. G. et al. Rad51 Paralogs Remodel Pre-synaptic Rad51 Filaments to Stimulate Homologous Recombination. **Cell**, 2015.

TETREAU, G. et al. UV light and urban pollution: Bad cocktail for mosquitoes?

Aquatic Toxicology, v. 146, p. 52–60, 2014.

TOUEILLE, M. et al. The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase  $\beta$  and increases its DNA substrate utilisation efficiency: Implications for DNA repair. Nucleic Acids Research, 2004.

URINGA, E.-J. et al. RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. **Molecular Biology of the Cell**, 2012.

VALLE, D.; NACIF PIMENTA, D.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 2016.

WALLACE, S.; MURPHY, D.; SWEASY, J. Base excision repair and cancer. **Cancer letters**, v. 327, p. 73–89, 2012.

WALLACE, S. S. Base excision repair: A critical player in many games. **DNA Repair**, 2014.

WANG, B.; ELLEDGE, S. J. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. **Proceedings of** 

the National Academy of Sciences, v. 104, n. 52, p. 20759–20763, 2007.

WANG, J. et al. PTIP associates with artemis to dictate DNA repair pathway choice. **Genes and Development**, 2014.

WANG, W. et al. The human Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex stimulates flap endonuclease 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2004.

WEI, L. et al. Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose).

Journal of cell science, v. 126, n. Pt 19, p. 4414–4423, 2013.

WESSBECHE, I. M.; BRIEGER, A. Phosphorylation meets DNA mismatch repairDNA Repair, 2018.

WEST, S. C. et al. Resolution of recombination intermediates: Mechanisms and

**regulation**. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Anais**...2016 WHITAKER, A. M. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, 2017.

WHO. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 3 jun. 2019a.

WHO. Yellow fever – Brazil. [s.l: s.n.].

WILSON, M. A. et al. Pif1 helicase and Polδ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. **Nature**, 2013.

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaksJournal of Biological Chemistry, 2018.

WYATT, H. D. M. et al. Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for holliday junction resolution in human cells. **Molecular Cell**, 2013.

YAMAMOTO, T. et al. Interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and a DnaJ induced by DNA damage. **Journal of Plant Research**, v. 118, n. 2, p. 91–97, 2005.

YELAMOS, J. et al. PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development. American Journal of Cancer Research, 2011.

YOO, S.; MCKEE, B. D. Functional analysis of the Drosophila Rad5l gene (spn-A) in repair of DNA damage and meiotic chromosome segregation. **DNA Repair**, v. 4, n. 2, p. 231–242, 2005.

ZANNINI, L.; DELIA, D.; BUSCEMI, G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. **Journal of Molecular Cell Biology**, 2014.

ZHANG, Q. et al. Multiple Forms of Human DNA Polymerase Delta Sub-Assembling in Cellular DNA Transactions. **Current Protein & Peptide Science**, 2016.

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

ZOU, L.; LIU, D.; ELLEDGE, S. J. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 13827–13832, 2003.

## 8. ANEXOS

Anexo 1: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Função molecular.

PANTHER GO-Slim Molecular Function	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
ligase activity (GO:0016874)	24	264	4,914x10 <sup>-6</sup>	0,000198
catalytic activity, acting on RNA (GO:0140098)	17	168	3,312x10 <sup>-5</sup>	0,000396
identical protein binding (GO:0042802)	6	23	0,0001612	0,0005941
nucleotidyltransferase activity (GO:0016779)	9	70	0,0004857	0,0007921
ubiquitin-like protein conjugating enzyme activity (GO:0061650)	11	105	0,000595	0,0009901

Anexo 2: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Processo biológico.

DEG: genes diferencialmente expressos. NonDEG: genes não diferencialmente expressos. FDR: *false Discovery rate*.

PANTHER GO-Slim Biological Process	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	18	95	7,38x10 <sup>-9</sup>	5,568x10 <sup>-05</sup>
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	22	211	2,33x10 <sup>-6</sup>	0,0001114
tRNA metabolic process (GO:0006399)	11	70	2,856x10 <sup>-5</sup>	0,000167
cellular response to stress (GO:0033554)	23	279	4,612x10 <sup>-5</sup>	0,0002227
endosome organization (GO:0007032)	4	5	8,756x10 <sup>-5</sup>	0,0002784
cellular response to starvation (GO:0009267)	7	33	0,0001619	0,0003341
formation of translation initiation ternary complex (GO:0001677)	21	274	0,000244	0,0003898
translational elongation (GO:0006414)	21	274	0,000244	0,0004454
translational termination (GO:0006415)	21	274	0,000244	0,0005011
autophagy (GO:0006914)	8	49	0,0002755	0,0005568
process utilizing autophagic mechanism (GO:0061919)	8	49	0,0002755	0,0006125
translation (GO:0006412)	23	321	0,000314	0,0006682
double-strand break repair (GO:0006302)	6	27	0,0003842	0,0007238
autophagy of mitochondrion (GO:0000422)	7	44	0,0007563	0,0007795
inner mitochondrial membrane organization (GO:0007007)	4	11	0,0008219	0,0008352

Anexo 3: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Componente celular.

PANTHER GO-Slim Cellular Component	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
cell wall (GO:0005618)	4	3	2,727x10 <sup>-5</sup>	0,0002232
external encapsulating structure (GO:0030312)	4	3	2,727x10 <sup>-5</sup>	0,0004464
cytoplasmic part (GO:0044444)	100	2204	0,0002594	0,0006696

Anexo 4: Enriquecimento funcional do grupo 1 - Classe proteica.

DEG: genes diferencialmente expressos. NonDEG: genes não diferencialmente expressos. FDR: *false Discovery rate*.

PANTHER Protein Class	DEG	NonDEG	Fisher.p	<b>FDR10%</b>
aminoacyl-tRNA synthetase (PC00047)	7	27	4,167x10 <sup>-5</sup>	0,000465 1
basic leucine zipper transcription factor (PC00056)	4	10	0,0005268	0,000930 2
ATP-binding cassette (ABC) transporter (PC00003)	10	91	0,0006371	0,001395 3
translation initiation factor (PC00224)	9	81	0,0010926	0,001860 5
translation factor (PC00223)	10	101	0,001325	0,002325 6
ligase (PC00142)	20	313	0,0016011	0,002790 7
decarboxylase (PC00089)	4	16	0,0022247	0,003255 8

Anexo 5: Enriquecimento funcional do grupo 2 - Vias.

PANTHER Pathways	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
Unclassified (UNCLASSIFIED)	538	20046	9,611x10 <sup>-6</sup>	0,0006098
ATP synthesis (P02721)	3	2	0,0001332	0,0012195
Pyrimidine Metabolism (P02771)	3	5	0,0007067	0,0018293

Anexo 6: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Função molecular.

PANTHER GO-Slim Molecular	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
Function			-	
(GO:0016491)	80	558	1,675x10 <sup>-31</sup>	0,000198
proton transmembrane transporter activity (GO:0015078)	32	131	2,9735x10 <sup>-19</sup>	0,000396
catalytic activity (GO:0003824)	220	5070	$8.7802 \times 10^{-13}$	0.0005941
monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity (GO:0015077)	34	276	1,5382x10 <sup>-12</sup>	0,0007921
electron transfer activity (GO:0009055)	9	9	1,7878x10 <sup>-10</sup>	0,0009901
oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors (GO:0016679)	6	4	5,2849x10 <sup>-8</sup>	0,0011881
ion transmembrane transporter activity (GO:0015075)	46	731	1,9551x10 <sup>-7</sup>	0,0013861
proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism (GO:0046933)	6	6	2,2252x10 <sup>-7</sup>	0,0015842
cation transmembrane transporter activity (GO:0008324)	39	584	4,0853x10 <sup>-7</sup>	0,0017822
inorganic cation transmembrane transporter activity (GO:0022890)	37	557	8,9869x10 <sup>-7</sup>	0,0019802
oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor (GO:0016616)	9	36	1,7501x10 <sup>-6</sup>	0,0021782
oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors (GO:0016614)	9	37	2,1264x10 <sup>-6</sup>	0,0023762
hydrolase activity (GO:0016787)	91	2147	1,2513x10 <sup>-5</sup>	0,0025743
transmembrane transporter activity (GO:0022857)	52	1034	1,615x10 <sup>-5</sup>	0,0027723
cytochrome-c oxidase activity (GO:0004129)	5	10	2,6167x10 <sup>-5</sup>	0,0029703
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors (GO:0016627)	6	27	0,00016842	0,0031683
ligase activity (GO:0016874)	19	269	0,00018239	0,0033663
ligase activity, forming carbon- sulfur bonds (GO:0016877)	10	92	0,00029151	0,0035644
transporter activity (GO:0005215)	53	1222	0.00045948	0.0037624

Anexo 6: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Função molecular. DEG: genes diferencialmente expressos. NonDEG: genes não diferencialmente expressos. FDR: *false Discovery rate*. Continuação.

PANTHER GO-Slim Molecular Function	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
peptidase activity, acting on L- amino acid peptides (GO:0070011)	28	535	0,00075401	0,0039604
lipid binding (GO:0008289)	4	14	0,00097301	0,0041584
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds (GO:0016810)	8	72	0,00101285	0,0043564
peptidase activity (GO:0008233)	29	576	0,00108189	0,0045545
dioxygenase activity (GO:0051213)	3	6	0,00124344	0,0047525
solute:proton symporter activity (GO:0015295)	7	59	0,00146496	0,0049505
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances (GO:0042626)	11	137	0,00154349	0,0051485
flavin adenine dinucleotide binding (GO:0050660)	5	29	0,00162105	0,0053465
inorganic anion transmembrane transporter activity (GO:0015103)	6	44	0,0016715	0,0055446
dicarboxylic acid transmembrane transporter activity (GO:0005310)	3	7	0,00174265	0,0057426
carbohydrate transmembrane transporter activity (GO:0015144)	7	61	0,00174517	0,0059406
ATPase activity, coupled to movement of substances (GO:0043492)	11	159	0,00450973	0,0061386
cofactor binding (GO:0048037)	6	58	0,00583714	0,0063366
metallopeptidase activity (GO:0008237)	11	167	0,00632952	0,0065347
peptidase activity, acting on L- amino acid peptides (GO:0070011)	28	535	0,00075401	0,0039604

Anexo 7: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Processo biológico. DEG: genes diferencialmente expressos. NonDEG: genes não diferencialmente expressos. FDR: *false* Discovery rate.

PANTHER GO-Slim Biological Process	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
organic substance catabolic process (GO:1901575)	35	194	9,629x10 <sup>-19</sup>	5,5679E-05
oxidation-reduction process (GO:0055114)	29	127	3,688x10 <sup>-18</sup>	0,00011136
catabolic process (GO:0009056)	36	263	7,629x10 <sup>-16</sup>	0,00016704
carboxylic acid catabolic process (GO:0046395)	20	61	1,718x10 <sup>-15</sup>	0,00022272
organic acid catabolic process (GO:0016054)	20	61	1,718x10 <sup>-15</sup>	0,0002784
ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	16	29	1,803x10 <sup>-15</sup>	0,00033408
energy coupled proton transport, down electrochemical gradient (GO:0015985)	16	29	1,803x10 <sup>-15</sup>	0,00038976
oxidative phosphorylation (GO:0006119)	16	33	8,566x10 <sup>-15</sup>	0,00044543
ATP metabolic process (GO:0046034)	16	34	1,233x10 <sup>-14</sup>	0,00050111
proton transmembrane transport (GO:1902600)	17	55	4,885x10 <sup>-13</sup>	0,00055679
mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775)	12	18	1,155x10 <sup>-12</sup>	0,00061247
ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042773)	12	19	1,845x10 <sup>-12</sup>	0,00066815
purine ribonucleotide metabolic process (GO:0009150)	16	56	6,418x10 <sup>-12</sup>	0,00072383
cellular respiration (GO:0045333)	21	116	7,216x10 <sup>-12</sup>	0,00077951
energy derivation by oxidation of organic compounds (GO:0015980)	21	116	7,216x10 <sup>-12</sup>	0,00083519
ribonucleotide metabolic process (GO:0009259)	16	57	8,044x10 <sup>-12</sup>	0,00089087
fatty acid catabolic process (GO:0009062)	12	23	1,002x10 <sup>-11</sup>	0,00094655
ribose phosphate metabolic process (GO:0019693)	16	71	1,338x10 <sup>-10</sup>	0,00100223
lipid metabolic process (GO:0006629)	19	124	8,687x10 <sup>-10</sup>	0,00105791
inorganic cation transmembrane transport (GO:0098662)	17	114	9,462x10 <sup>-09</sup>	0,00111359
inorganic ion transmembrane transport (GO:0098660)	17	114	9,462x10 <sup>-09</sup>	0,00116927

Anexo 7: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Processo biológico. DEG: genes diferencialmente expressos. NonDEG: genes não diferencialmente expressos. FDR: *false* Discovery rate.

PANTHER GO-Slim Biological Process	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
ion transmembrane transport (GO:0034220)	17	114	9,462x10 <sup>-09</sup>	0,00122494
respiratory electron transport chain (GO:0022904)	13	76	1,244x10 <sup>-07</sup>	0,00128062
ion transport (GO:0006811)	21	234	5,581x10 <sup>-07</sup>	0,0013363
aerobic respiration (GO:0009060)	9	36	7,006x10 <sup>-07</sup>	0,00139198
carbohydrate derivative metabolic process (GO:1901135)	24	306	8,643x10 <sup>-07</sup>	0,00144766
mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c (GO:0006122)	5	6	2,542x10 <sup>-06</sup>	0,00150334
mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen (GO:0006123)	5	7	4,275x10 <sup>-06</sup>	0,00155902
coenzyme metabolic process (GO:0006732)	11	75	4,371x10 <sup>-06</sup>	0,0016147
carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	19	232	6,46x10 <sup>-06</sup>	0,00167038
organonitrogen compound metabolic process (GO:1901564)	18	214	7,982x10 <sup>-06</sup>	0,00172606
steroid metabolic process (GO:0008202)	7	26	8,127x10 <sup>-06</sup>	0,00178174
metabolic process (GO:0008152)	150	4418	8,172x10 <sup>-06</sup>	0,00183742
establishment of localization (GO:0051234)	51	1172	4,081x10 <sup>-05</sup>	0,0018931
transport (GO:0006810)	51	1172	4,081x10 <sup>-05</sup>	0,00194878
cellular amino acid catabolic process (GO:0009063)	7	37	5,856x10 <sup>-05</sup>	0,00200445
drug metabolic process (GO:0017144)	11	105	7,535x10 <sup>-05</sup>	0,00206013
cellular amino acid biosynthetic process (GO:0008652)	8	58	0,0001292	0,00211581
cellular metabolic process (GO:0044237)	67	1761	0,0001428	0,00217149
organonitrogen compound catabolic process (GO:1901565)	10	95	0,0001524	0,00222717
cofactor metabolic process (GO:0051186)	13	158	0,0001697	0,00228285
monovalent inorganic cation homeostasis (GO:0055067)	8	65	0,0002627	0,00233853
cellular amide metabolic process (GO:0043603)	5	22	0,0003276	0,00239421

Anexo 7: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Processo biológico.

PANTHER GO-Slim Biological Process	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
carboxylic acid metabolic process (GO:0019752)	6	39	0,0005343	0,00244989
oxoacid metabolic process (GO:0043436)	6	42	0,0007595	0,00250557
purine nucleobase biosynthetic process (GO:0009113)	4	15	0,0007976	0,00256125
cellular catabolic process (GO:0044248)	9	98	0,0008014	0,00261693
regulation of cellular pH (GO:0030641)	6	43	0,0008489	0,00267261
regulation of pH (GO:0006885)	6	43	0,0008489	0,00272829
aromatic amino acid family catabolic process (GO:0009074)	3	6	0,0008998	0,00278396
organic acid metabolic process (GO:0006082)	6	44	0,0009462	0,00283964
amide biosynthetic process (GO:0043604)	4	16	0,000979	0,00289532
cellular response to oxidative stress (GO:0034599)	4	16	0,000979	0,002951
response to oxidative stress (GO:0006979)	5	29	0,0009893	0,00300668
tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	5	29	0,0009893	0,00306236
primary metabolic process (GO:0044238)	22	436	0,001029	0,00311804
cellular modified amino acid metabolic process (GO:0006575)	7	63	0,0010954	0,00317372
carboxylic acid biosynthetic process (GO:0046394)	8	84	0,0012438	0,0032294
organic acid biosynthetic process (GO:0016053)	8	84	0,0012438	0,00328508
organophosphate catabolic process (GO:0046434)	4	18	0,0014254	0,00334076
lipid homeostasis (GO:0055088)	4	20	0,0019968	0,00339644
Unclassified (UNCLASSIFIED)	322	11811	0,0026632	0,00345212
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	5	39	0,0031997	0,0035078

Anexo 8: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Componente celular.

PANTHER GO-Slim Cellular	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
Component	220			
mitochondrial respiratory chain (GO:0005746)	19	21	3,758x10 <sup>-21</sup>	0,0002232
mitochondrial inner membrane (GO:0005743)	26	125	9,263x10 <sup>-16</sup>	0,0004464
organelle inner membrane (GO:0019866)	26	126	1,094x10 <sup>-15</sup>	0,0006696
mitochondrial respiratory chain complex I (GO:0005747)	12	9	3,952x10 <sup>-15</sup>	0,0008929
proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)	14	19	4,448x10 <sup>-15</sup>	0,0011161
organelle envelope (GO:0031967)	29	181	8,682x10 <sup>-15</sup>	0,0013393
mitochondrion (GO:0005739)	26	274	6,832x10 <sup>-09</sup>	0,0015625
proton-transporting ATP synthase complex (GO:0045259)	6	8	3,304x10 <sup>-07</sup>	0,0017857
membrane-bounded organelle (GO:0043227)	38	656	7,142x10 <sup>-07</sup>	0,0020089
mitochondrial respiratory chain complex III (GO:0005750)	4	4	1,661x10 <sup>-05</sup>	0,0022321
mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex (GO:0005753)	4	5	2,936x10 <sup>-05</sup>	0,0024554
Unclassified (UNCLASSIFIED)	352	12632	0.0001007	0.0026786
vacuolar membrane (GO:0005774)	5	30	0.0010601	0.0029018
lysosome (GQ:0005764)	6	48	0.0013193	0.003125
lytic vacuole (GO:0000323)	6	48	0.0013193	0.0033482
lipid droplet ( $GO:0005811$ )	4	19	0.0016048	0.0035714
extracellular region (GO:0005576)	27	624	0.0020551	0.0037946
extracellular region part (GO:0044421)	25	567	0,0023241	0,0040179
membrane protein complex (GO:0098796)	16	302	0,0025693	0,0042411
mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o) (GO:0000276)	2	2	0,0029432	0,0044643
plasma membrane respiratory chain complex I (GO:0045272)	2	2	0,0029432	0,0046875
bounding membrane of organelle (GO:0098588)	5	44	0,0048078	0,0049107
mitochondrial protein complex (GO:0098798)	3	13	0,0051085	0,0051339

Anexo 9: Enriquecimento funcional do grupo 2 – Classe proteica.

PANTHER Protein Class	DEG	NonDEG	Fisher.p	FDR10%
oxidoreductase (PC00176)	83	427	2,338x10 <sup>-37</sup>	0,0004651
dehydrogenase (PC00092)	42	175	1,822x10 <sup>-22</sup>	0,0009302
ATP synthase (PC00002)	16	23	5,157x10 <sup>-15</sup>	0,0013953
oxygenase (PC00177)	21	76	6,166x10 <sup>-13</sup>	0,0018605
hydrolase (PC00121)	97	1511	1,635x10 <sup>-11</sup>	0,0023256
reductase (PC00198)	20	93	1,069x10 <sup>-10</sup>	0,0027907
protease (PC00190)	51	757	3,09x10 <sup>-07</sup>	0,0032558
oxidase (PC00175)	16	116	1,692x10 <sup>-06</sup>	0,0037209
cation transporter (PC00068)	23	242	4,007x10 <sup>-06</sup>	0,004186
metalloprotease (PC00153)	20	227	4,506x10 <sup>-05</sup>	0,0046512
acyltransferase (PC00042)	13	137	0,000487	0,0051163
serine protease (PC00203)	20	276	0,0005048	0,0055814
lyase (PC00144)	11	103	0,0005272	0,0060465
isomerase (PC00135)	7	44	0,0006758	0,0065116
carbohydrate transporter (PC00067)	10	90	0,000705	0,0069767
transporter (PC00227)	46	940	0,0014329	0,0074419
anion channel (PC00049)	4	14	0,0016029	0,007907
acetyltransferase (PC00038)	9	91	0,0026756	0,0083721
phosphodiesterase (PC00185)	5	33	0,0047746	0,0088372
glucosidase (PC00108)	4	21	0,0056341	0,0093023
hydratase (PC00120)	3	10	0,0057251	0,0097674
epimerase/racemase (PC00096)	4	23	0,0074642	0,0102326
extracellular matrix linker protein (PC00101)	4	24	0,00851	0,0106977
growth factor (PC00112)	4	25	0,0096472	0,0111628

Proteínas da via de sinalização de ATR	A. aegypti
MTA2	Х
NR4A2	AAEL022402-PA
	AAEL022402-PB
	AAEL022402-PC
TIPIN	AAEL003648-PC
	AAEL003648-PD
TIMELESS	AAEL019522-PA
CLSPN	AAEL027754-PA
	AAEL000154-PA
ATR	AAEL010069-PB
	AAEL024373-PA
ATRIP	AAEL002238-PA
SMARCAL1	AAEL006963-PA
RPA1	AAEL012826-PA
RPA2	AAEL014250-PA
RPA3	AAEL007291-PA
RAD17	AAEL027380-PA
RFC1	AAEL001324-PB
RFC2	AAEL020929-PA
RFC3	AAEL007581-PA
	AAEL024947-PA
RFC4	AAEL006788-PA
RFC5	AAEL009465-PA
RAD9	AAEL010759-PA
RAD1	AAEL025383-PA
	AAEL025383-PB
	AAEL009701-PB
	AAEL009701-PC
	AAEL009701-PD
HUS1	AAEL006107-PA
RHINO	Х
UBR5	Х
TOPBP1	AAEL013962-PB
CHK1	AAEL018254-PA
	AAEL018254-PB

Anexo 10: Lista de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de ATR em A. aegypti.

Proteínas da via de sinalização de DSB	A. aegypti
NBN	AAEL023570-PA
	AAEL014377-PA
	AAEL014377-PB
MRE11	AAEL023601-PA
RAD50	AAEL011772-PA
	AAEL005245-PB
	AAEL026871-PA
	AAEL020323-PA
	AAEL021668-PA
	AAEL025895-PA
KPNA2	AAEL012960-PA
ATM	AAEL014900-PB
	AAEL014900-PC
H2AX	AAEL012499-PA
KAT5	AAEL014072-PB
	AAEL007544-PA
CHK2	AAEL007544-PB
	AAEL007544-PC
SMARCA5	AAEL003950-PA
BAZ1B	Х
H2AX	Х
MDC1	AAEL012508-PB
EYA1	AAEL019952-PA
	AAEL019952-PB
EYA2	Х
EYA3	Х
EYA4	Х
APBB1	Х
MAPK8	AAEL008634-PC
	AAEL008634-PD
	AAEL008634-PE
	AAEL008634-PF
	AAEL008634-PG
	AAEL008634-PH
	AAEL008634-PI
	AAEL008634-PJ
KDM4A	Х

Anexo 11: Lista de proteínas envolvidas na sinalização de DSB em A. aegypti.

\_
KDM4BAAEL008260-PB AAEL008260-PC AAEL008260-PE AAEL008260-PE AAEL008260-PE AAEL008266-PB AAEL008266-PCRNF8XPIAS1AAEL015099-PE AAEL015099-PEPIAS4XUBC9AAEL025779-PA AAEL02306-PAHERC2AAEL011873-PA AAEL011873-PA AAEL011873-PB BAEL011873-PEUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PEUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PEUBE2NAAEL011873-PA AAEL011873-PERNF168AAEL011873-PA AAEL011873-PERNF168AAEL011873-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PFTP53BP1X AAEL021836-PA AAEL021836-PARIF1AAEL021836-PA AAEL021836-PB AAEL021836-PB AAEL021836-PB AAEL021836-PBRNF1AAEL021836-PB AAEL021836-PC AAEL01353-PARNF1AAEL021836-PB AAEL021836-PB AAEL01353-PARS27AAAEL007672-PA AAEL013536-PD PPP5CAAEL007672-PB AAEL013536-PDAAEL007672-PA AAEL013536-PDPPP5CAAEL00580-PA AAEL013536-PDUIMC1 (RAP80)XBRCA1XBAAM1 (NBA1)XBRC24(5)X		AAEL008260-PA
KDM4BAAEL008260-PC AAEL008260-PD AAEL008260-PE AAEL008260-PF AAEL008266-PGRNF8XPIAS1AAEL015099-PE AAEL015099-PFPIAS4XUBC9AAEL002306-PA AAEL0127903-PA AAEL01873-PA AAEL011873-PA AAEL011873-PB AAEL011873-PEUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PE AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PA AAEL017357-PE AAEL013536-PCPAXP1AAEL02836-PA AAEL013536-PCPAXP1AAEL025635-PA AAEL013536-PCPAXP1AAEL007672-PA AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PA AUIMC1 (RAP80)XBRCA1 BABAMI (NBA1)BABAMI (NBA1)XBRC41XBABAMI (NBA1)X		AAEL008260-PB
KDM4BAAEL008260-PD AAEL008260-PE AAEL008260-PF AAEL008266-PE AAEL008266-PCRNF8XPIAS1AAEL008266-PCRNF8XUBC9AAEL025779-PA AAEL027903-PAHERC2AAEL002306-PASUM01XUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PA AAEL011873-PCRNF168AAEL011357-PA AAEL01357-PB AAEL01357-PB AAEL01357-PE AAEL01357-PE AAEL01357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL013536-PARIF1AAEL021836-PC AAEL021836-PCPAXP1AAEL00356-PA AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PB AAEL013536-PB AAEL013536-PDPP5CAAEL003508-PA AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PDPPP5CAAEL003508-PA AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PDPPP5CAAEL003508-PA AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PDPP5CAAEL003508-PA AAEL013536-PD AAEL013536-PD AAEL013536-PDPP5CAAEL003508-PA AAEL013536-PD AA		AAEL008260-PC
KDM4BAAEL008260-PE AAEL008260-PF AAEL008266-PB AAEL008266-PCRNF8XPIAS1AAEL015099-PE AAEL015099-PFPIAS4XUBC9AAEL025779-PA AAEL027903-PAHERC2AAEL011873-PA AAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PCUBE2NAAEL011357-PA AAEL011873-PCRNF168AAEL017357-PB AAEL017357-PB AAEL017357-PE AAEL017356-PE AAEL013536-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PD PPP5CPPSCAAEL005080-PA UIMC1 (RAP80)XBRCA1XXBRCA1XMBRC3 (BRCC36)XMBABAM1 (NBA1)XBBRE (BRCC45)X		AAEL008260-PD
AAEL008260-PF AAEL008266-PB AAEL008266-PC RNF8 X PIAS1 AAEL015099-PE AAEL015099-PF PIAS4 X UBC9 AAEL025779-PA AAEL025779-PA AAEL027903-PA HERC2 AAEL002306-PA SUMO1 X UBE2V2 AAEL011873-PA AAEL011873-PB AAEL011873-PC UBE2N AAEL011873-PA AAEL011873-PC UBE2N AAEL011873-PA AAEL011873-PC UBE2N AAEL011873-PA AAEL011873-PC UBE2N AAEL011873-PA AAEL011873-PC UBE2N AAEL01357-PA AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PF TP53BP1 X RIF1 AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PB AAEL007672-PA KAT8 AAEL007672-PA AAEL007672-PA AAEL013536-PB AAEL013536-PD PP5C AAEL003536-PA AAEL013536-PD PP5C AAEL013536-PD AAEL013536-PD MAEL013536-PD AAEL0135	KDM4B	AAEL008260-PE
AAEL010522-PA AAEL008266-PB AAEL008266-PC RNF8 X PIAS1 AAEL015099-PE AAEL015099-PF PIAS4 X UBC9 AAEL025779-PA AAEL027903-PA HERC2 AAEL002306-PA SUMO1 X UB2V2 AAEL011873-PA AAEL011873-PC UB2N AAEL011873-PC UB2N AAEL011873-PC UB2N AAEL011873-PC UB2N AAEL011873-PC AAEL011873-PC UB2N AAEL011873-PC AAEL017357-PB AAEL017357-PB AAEL017357-PB AAEL017357-PF TP53BP1 X RIF1 AAEL017357-PF TP53BP1 X RIF1 AAEL021836-PA AAEL021836-PC AAEL021836-PC AAEL021836-PC AAEL021836-PC AAEL017357-PB AAEL007672-PA AAEL007672-PA AAEL007672-PA AAEL017356-PC AAEL017356-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PD PPP5C AAEL005080-PA UIMC1 (RAP80) X ABRAXAS (FAM175A) X BRCC3 (BRCC36) X BABAM1 (NBA1) X BRC (BRCC45) X		AAEL008260-PE
AAEL008266-PERNF8XPIAS1AAEL015099-PEAAEL015099-PFAAEL015099-PFPIAS4XUBC9AAEL025779-PAAAEL022903-PAHERC2AAEL011873-PASUMO1XUBE2V2AAEL011873-PAUBE2V2AAEL011873-PAMERC3AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PCRNF168AAEL011873-PCRNF168AAEL01357-PAAAEL017357-PEAAEL017357-PCAAEL017357-PFAAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PAAAEL021836-PCAAEL021836-PCPAXP1AAEL021836-PCAAEL013536-PDAAEL013536-PDPPP5CAAEL013536-PCAAEL013536-PDPPP5CPPP5CAAEL013536-PCAAEL013536-PDXBRCA1XBAAD1XBRC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X		AAEL 010522-PA
AAEL008266-PCRNF8XPIAS1AAEL015099-PEPIAS4XUBC9AAEL025779-PAAAEL022903-PAHERC2AAEL011873-PASUMO1XQBE2V2AAEL011873-PBAAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PAAAEL011873-PCUBE2NAAEL011357-PAAAEL0117357-PEAAEL017357-PCAAEL017357-PCAAEL017357-PCAAEL017357-PEAAEL017357-PEAAEL017357-PEAAEL017357-PEAAEL017357-PFTP53BP1XAAEL02836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PAAAEL013536-PERPS27AAAEL013536-PEAAEL013536-PDPP5CAAEL013536-PBAAEL013536-PDPP5CAAEL013536-PCAAEL013536-PDPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRC3 (BRCC36)XBABAMI (NBA1)XBRE (BRCC45)X		AAFI 008266-PB
RNF8XPIAS1AAEL015099-PE AAEL015099-PFPIAS4XUBC9AAEL025779-PA AAEL027903-PAHERC2AAEL002306-PASUMO1XUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2V2AAEL011873-PCUBE2NAAEL014642-PB RNF168RNF168AAEL01357-PA AAEL017357-PB AAEL017357-PB AAEL017357-PB AAEL017357-PE AAEL01356-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PD PPP5CPP5CAAEL005080-PA UIMC1 (RAP80)XBRCA1XXBARAMI (NBA1)XBRCC3 (BRCC36) B XBARMI (NBA1)XBRE (BRCC45)X		$\Delta \Delta EL 008266-PC$
RNF8XPIAS1AAEL015099-PE AAEL015099-PFPIAS4XUBC9AAEL025779-PA AAEL027903-PAHERC2AAEL002306-PASUMO1XUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PCUBE2NAAEL011875-PA AAEL01357-PA AAEL01357-PATRIP12AAEL0126428-PA AAEL017357-PE AAEL017357-PE AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL017357-PF AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL025635-PA AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PA AAEL007672-PB AAEL013536-PCRS27AAAEL007672-PA AAEL013536-PD AAEL013536-PDPP5CAAEL005080-PA UIMC1 (RAP80)XBRCA1XBRCA1XBRC3 (BRCC36)XBRC41XBRC41XBRC45)XBRCC45)X	DNEO	MALLOUO200-I C
PIAS1AAEL015099-PE AAEL015099-PFPIAS4XUBC9AAEL025779-PA AAEL0227903-PAHERC2AAEL002306-PASUMO1XUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PA AAEL011873-PGUBE2V2AAEL011873-PG AAEL011873-PCUBE2NAAEL014642-PB RNF168RNF168AAEL017357-PC AAEL017357-PC AAEL017357-PFTRIP12AAEL017357-PF AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PA AAEL017357-PFPAXP1AAEL025635-PA AAEL013536-PC AAEL013536-PCPAXP1AAEL007672-PA AAEL013536-PC AAEL013536-PCPAXP1AAEL013536-PC AAEL013536-PCPAS27AAAEL013536-PB AAEL013536-PD PP5CUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRC(BRCC45)X	RNF8	Х
AAEL015099-PF         PIAS4       X         UBC9       AAEL025779-PA         HERC2       AAEL002306-PA         SUMO1       X         UBE2V2       AAEL011873-PA         AAEL011873-PB       AAEL011873-PA         UBE2V2       AAEL011873-PB         UBE2N       AAEL011873-PC         UBE2N       AAEL014642-PB         RNF168       AAEL017357-PA         AAEL017357-PA       AAEL017357-PC         AAEL017357-PC       AAEL017357-PC         AAEL017357-PF       AAEL017357-PF         TP53BP1       X         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL017357-PF       AAEL017357-PF         TP53BP1       X         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL013536-PB       AAEL021836-PC         PAXP1       AAEL021836-PC         PAXP1       AAEL007672-PB         RPS27A       AAEL013536-PC         AAEL013536-PD       PP         PP5C       AAEL005080-PA         UIMC1 (RAP80)       X         ABRAXAS (FAM175A)       X         BRCC3 (BRCC36)       X         BABAM1 (NBA1)       X	PIAS1	AAEL015099-PE
PIAS4         X           UBC9         AAEL025779-PA AAEL027903-PA           HERC2         AAEL002306-PA           SUMO1         X           AAEL011873-PA           UBE2V2         AAEL011873-PA           UBE2V2         AAEL011873-PB           AAEL011873-PC           UBE2N         AAEL011873-PC           UBE2N         AAEL014642-PB           RNF168         AAEL001357-PA           AAEL017357-PB         AAEL017357-PC           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PF         AAEL017357-PF           TP53BP1         X           RIF1         AAEL021836-PA           AAEL021836-PC         PAXP1           AAEL021836-PC         PAXP1           AAEL007672-PA         AAEL007672-PA           AAEL013536-PD         PP           PP5C         AAEL013536-PC           AAEL013536-PC         AAEL013536-PD           PP5C         AAEL005080-PA           UIMC1 (RAP80)         X           ABRAXAS (FAM175A)         X           BRC3 (BRCC36)         X           BABAM1 (NBA1)         X           BRC (BRCC45)<		AAEL015099-PF
UBC9AAEL025779-PA AAEL027903-PAHERC2AAEL002306-PASUMO1XUBE2V2AAEL011873-PA AAEL011873-PB AAEL011873-PCUBE2NAAEL014642-PBRNF168AAEL001357-PATRIP12AAEL017357-PG AAEL017357-PC AAEL017357-PE AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL02836-PA AAEL017357-PFPAXP1AAEL021836-PA AAEL021836-PCRASEAAEL021836-PA AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PA AAEL007672-PA AAEL013536-PCKAT8AAEL013536-PG AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PA UIMC1 (RAP80)UIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	PIAS4	Х
UBC9         AAEL027903-PA           HERC2         AAEL002306-PA           SUMO1         X           UBE2V2         AAEL011873-PA           UBE2V2         AAEL011873-PB           AAEL011873-PC         AAEL011873-PC           UBE2N         AAEL014642-PB           RNF168         AAEL001357-PA           AAEL017357-PB         AAEL017357-PC           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PE         AAEL017357-PE           AAEL017357-PF         TP53BP1           X         AAEL017357-PF           FTP53BP1         X           AAEL017357-PF         AAEL017357-PF           TRIF1         AAEL021836-PA           AAEL017357-PF         AAEL017357-PF           TP53BP1         X           AAEL017357-PF         AAEL013536-PB           AAEL021836-PC         AAEL007672-PA           AAEL007672-PB         AAEL013536-PB           RPS27A         AAEL005080-PA           UIMC1 (RAP80)         X           ABRAXAS (FAM175A)         X           BRCC3 (BRCC36)         X           BABAM1 (NBA1)         X           BRE (BRCC45)<	LIDCO	AAEL025779-PA
HERC2         AAEL002306-PA           SUMO1         X           UBE2V2         AAEL011873-PA           AAEL011873-PB         AAEL011873-PC           UBE2N         AAEL014642-PB           RNF168         AAEL001357-PA           AAEL017357-PB         AAEL017357-PB           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PF         AAEL017357-PF           TP53BP1         X           RIF1         AAEL021836-PA           AAEL021836-PA         AAEL021836-PA           AAEL021836-PC         PAXP1           AAEL007672-PA         AAEL007672-PA           AAEL007672-PB         AAEL0013536-PC           PAXP1         AAEL0013536-PB           AAEL013536-PC         AAEL013536-PC           PAXP1         AAEL0013536-PB           RPS27A         AAEL0013536-PD           PP5C         AAEL005080-PA           UIMC1 (RAP80)         X           ABRAXAS (FAM175A)         X           BARC1         X           BARA1         X           BARA1 (NBA1)         X           BRC41         X	UBC9	AAEL027903-PA
SUMO1XSUMO1XAAEL011873-PAUBE2V2AAEL011873-PCUBE2NAAEL011873-PCUBE2NAAEL014642-PBRNF168AAEL001357-PAAAEL017357-PBAAEL017357-PCAAEL017357-PCAAEL017357-PCAAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PAAAEL021836-PAAAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PBRPS27AAAEL007672-PBAAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRC (BRCC45)X	HERC2	AAEL002306-PA
Solidor         A           UBE2V2         AAEL011873-PA           UBE2N         AAEL011873-PC           UBE2N         AAEL011873-PC           RNF168         AAEL001357-PA           AAEL001357-PA         AAEL001357-PA           AAEL017357-PB         AAEL017357-PC           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PF         AAEL017357-PF           TP53BP1         X           RIF1         AAEL021836-PA           AAEL021836-PA         AAEL021836-PA           AAEL021836-PA         AAEL021836-PB           AAEL021836-PC         PAXP1           AAEL007672-PA         AAEL007672-PA           AAEL0013536-PC         AAEL013536-PD           PPP5C         AAEL0013536-PD           PPP5C         AAEL005080-PA           UIMC1 (RAP80)         X           ABRAXAS (FAM175A)         X           BARD1         X           BARAM1 (NBA1)         X           BRC41         X           BABAM1 (NBA1)         X	SUM01	X
AAELUT1873-FAUBE2V2AAELUT1873-PBAAELUT1873-PCAAELUT1873-PCUBE2NAAELUT4642-PBRNF168AAEL001357-PAAAELU7357-PAAAELUT7357-PBAAELU77357-PCAAELUT7357-PCAAELU7357-PFAAELUT7357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PAAAEL021836-PCAAELU021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PCAAELU3536-PCAAELU3536-PCPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBABAM1 (NBA1)XBRC (BRCC45)X		
OBE2V2AAEL011873-PB AAEL011873-PCUBE2NAAEL014642-PBRNF168AAEL001357-PARNF168AAEL017357-PB AAEL017357-PE AAEL017357-PETRIP12AAEL017357-PC AAEL017357-PE AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PA AAEL021836-PA AAEL021836-PE AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PA AAEL007672-PB RPS27ARPS27AAAEL007672-PB AAEL013536-PD PPP5CPP5CAAEL005080-PA UIMC1 (RAP80)UIMC1 (RAP80)XBRCA1XBRCA1XBRCA1XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	LIDEONO	AAELUII0/J-PA
AAEL011873-PCUBE2NAAEL014642-PBRNF168AAEL001357-PAAAEL017357-PAAAEL017357-PBAAEL017357-PCAAEL017357-PCAAEL017357-PFAAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PAAAEL021836-PCAAEL021836-PCPAXP1AAEL007672-PAKAT8AAEL007672-PARPS27AAAEL013536-PCPAXP1AAEL007672-PAAAEL013536-PDPPP5CAAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XXBRCA1XBARD1XBARM1 (NBA1)XBRC (BRCC45)X	UBE2V2	AAELUI18/3-PB
UBE2N         AAEL014642-PB           RNF168         AAEL001357-PA           AAEL026428-PA         AAEL017357-PB           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PE         AAEL017357-PF           TP53BP1         X           RIF1         AAEL021836-PA           AAEL021836-PA         AAEL021836-PA           AAEL021836-PA         AAEL021836-PA           RIF1         AAEL025635-PA           KAT8         AAEL007672-PA           RAEL007672-PB         AAEL007672-PA           KAT8         AAEL013536-PB           RPS27A         AAEL013536-PD           PPP5C         AAEL005080-PA           UIMC1 (RAP80)         X           ABRAXAS (FAM175A)         X           BRCA1         X           BARD1         X           BARM1 (NBA1)         X           BRE (BRCC45)         X		AAELUI18/3-PC
RNF168         AAEL001357-PA           AAEL026428-PA         AAEL017357-PB           AAEL017357-PC         AAEL017357-PC           AAEL017357-PD         AAEL017357-PF           TP53BP1         X           RIF1         AAEL021836-PA           AAEL021836-PA         AAEL021836-PB           AAEL021836-PC         PAXP1           AAEL025635-PA         AAEL007672-PB           RFS27A         AAEL013536-PC           PAXP1         AAEL013536-PC           AAEL013536-PD         PPP5C           VIMC1 (RAP80)         X           ABRAXAS (FAM175A)         X           BRCA1         X           BARD1         X           BABAM1 (NBA1)         X           BRE (BRCC45)         X	UBE2N	AAEL014642-PB
AAEL026428-PA           AAEL017357-PB           AAEL017357-PC           AAEL017357-PD           AAEL017357-PE           AAEL017357-PF           TP53BP1           X           RIF1           AAEL021836-PA           AAEL021836-PA           AAEL021836-PA           AAEL021836-PA           AAEL021836-PA           AAEL021836-PA           AAEL021836-PA           AAEL021836-PB           AAEL021836-PC           PAXP1           AAEL007672-PA           AAEL007672-PB           RPS27A           AAEL013536-PC           AAEL013536-PD           PPP5C           UIMC1 (RAP80)           X           BRCA1           X           BARD1           X           BARD1           X           BABAM1 (NBA1)           X           BRE (BRCC45)	RNF168	AAEL001357-PA
TRIP12       AAEL017357-PB         AAEL017357-PC       AAEL017357-PC         AAEL017357-PE       AAEL017357-PF         TP53BP1       X         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL021836-PB       AAEL021836-PB         AAEL021836-PC       PAXP1         AAEL025635-PA       AAEL007672-PA         KAT8       AAEL007672-PB         RPS27A       AAEL013536-PC         PAXP1       AAEL013536-PB         AAEL013536-PC       AAEL013536-PC         AAEL013536-PB       AAEL013536-PB         RPS27A       AAEL013536-PC         AAEL013536-PD       PP         PP5C       AAEL005080-PA         UIMC1 (RAP80)       X         BRCA1       X         BARD1       X         BARD1       X         BABAM1 (NBA1)       X         BRE (BRCC45)       X		AAEL026428-PA
TRIP12       AAEL017357-PC         AAEL017357-PD       AAEL017357-PE         AAEL017357-PF       AAEL017357-PF         TP53BP1       X         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL021836-PB       AAEL021836-PC         PAXP1       AAEL025635-PA         KAT8       AAEL007672-PA         RPS27A       AAEL013536-PB         PPP5C       AAEL013536-PC         PPP5C       AAEL013536-PC         VIMC1 (RAP80)       X         UIMC1 (RAP80)       X         BRCA1       X         BARD1       X         BARD1       X         BABAM1 (NBA1)       X         BRE (BRCC45)       X		AAEL017357-PB
IRIP12       AAEL017357-PD         AAEL017357-PE       AAEL017357-PE         TP53BP1       X         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL021836-PB       AAEL021836-PC         PAXP1       AAEL025635-PA         KAT8       AAEL007672-PA         RPS27A       AAEL013536-PB         PPP5C       AAEL013536-PC         PPP5C       AAEL013536-PD         PPP5C       AAEL005080-PA         UIMC1 (RAP80)       X         BRCA1       X         BARD1       X         BARD1       X         BABAM1 (NBA1)       X         BRE (BRCC45)       X	TD ID 10	AAEL017357-PC
AAEL017357-PE AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PA AAEL021836-PB AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PA AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PA UIMC1 (RAP80)UIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	TRIP12	AAEL017357-PD
AAEL017357-PFTP53BP1XRIF1AAEL021836-PAAAEL021836-PBAAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PARPS27AAAEL013536-PBRPS27AAAEL013536-PDPPP5CAAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X		AAEL017357-PE
TP53BP1       X         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL021836-PB       AAEL021836-PC         PAXP1       AAEL025635-PA         KAT8       AAEL007672-PA         KAT8       AAEL007672-PB         RPS27A       AAEL013536-PC         PPP5C       AAEL013536-PC         UIMC1 (RAP80)       X         BRCA1       X         BRCC3 (BRCC36)       X         BABAM1 (NBA1)       X         BRE (BRCC45)       X		AAEL017357-PF
IT 5351 1       A         RIF1       AAEL021836-PA         AAEL021836-PC         PAXP1       AAEL025635-PA         KAT8       AAEL007672-PA         KAT8       AAEL007672-PB         RPS27A       AAEL013536-PC         PPP5C       AAEL013536-PC         UIMC1 (RAP80)       X         BRCA1       X         BRCC3 (BRCC36)       X         BABAM1 (NBA1)       X         BRE (BRCC45)       X	TP53BP1	X
RIF1AAEL021836-PA AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PA AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PC AAEL013536-PC AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XBRCA1XBRCA1XBRCC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X		A A EL 021926 DA
RIF1AAEL021836-PB AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PA AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PB AAEL013536-PC AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X	DIE1	AAEL021030-PA
PAXP1AAEL021836-PCPAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PARPS27AAAEL013536-PBRPS27AAAEL013536-PCAAEL013536-PDPPP5CPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X	KIFI	AAELU21030-PD
PAXP1AAEL025635-PAKAT8AAEL007672-PAKAT8AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PBAAEL013536-PCAAEL013536-PCPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X		AAEL021836-PC
KAT8AAEL007672-PA AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PB AAEL013536-PC AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X	PAXP1	AAEL025635-PA
AAEL007672-PBRPS27AAAEL013536-PBRPS27AAAEL013536-PCAAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X	ΚΑΤ8	AAEL007672-PA
RPS27AAAEL013536-PB AAEL013536-PC AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBRE (BRCC45)X		AAEL007672-PB
RPS27AAAEL013536-PC AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X		AAEL013536-PB
AAEL013536-PDPPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	RPS27A	AAEL013536-PC
PPP5CAAEL005080-PAUIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X		AAEL013536-PD
UIMC1 (RAP80)XABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	PPP5C	AAEL005080-PA
ABRAXAS (FAM175A)XBRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	UIMC1 (RAP80)	X
BRCA1XBARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	ABRAXAS (FAM175A)	X
DRCA1ABARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X		V V
BARD1XBRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X		
BRCC3 (BRCC36)XBABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	BAKDI	X
BABAM1 (NBA1)XBRE (BRCC45)X	BRCC3 (BRCC36)	X
BRE (BRCC45) X	BABAM1 (NBA1)	Х
	BRE (BRCC45)	Χ

Anexo 11: Lista de proteínas envolvidas na sinalização de DSB em A. aegypti. Continuação.

p53	AAEL023585-PA AAEL023585-PB AAEL023585-PC
SMC1A	AAEL005802-PA
UBP11 (USP11)	Х
SIRT1	Х
RAD18	Х

Anexo 12: Lista de histonas H2A encontradas em A. aegypti.

Histonas H2A encontradas em A. aegypti
AAEL000518-PB
AAEL003669-PA
AAEL003687-PB
AAEL003706-PB
AAEL007005-PA
AAEL012499-PA
AAEL020050-PA
AAEL020066-PA
AAEL020249-PA
AAEL020309-PA
AAEL020348-PA
AAEL020601-PA
AAEL020605-PA
AAEL020675-PA
AAEL020887-PA
AAEL020927-PA
AAEL021053-PA
AAEL021158-PA
AAEL021193-PA
AAEL021347-PA
AAEL021459-PA
AAEL021518-PA
AAEL021635-PA
AAEL021638-PA
AAEL021644-PA
AAEL021778-PA
AAEL022062-PA
AAEL022071-PA
AAEL022161-PA
AAEL022197-PA
AAEL022584-PA
AAEL022643-PA
AAEL022701-PA
AAEL022702-PA
AAEL022745-PA
AAEL022751-PA
AAEL022752-PA

AAEL022755-PA
AAEL022789-PA
AAEL022789-PB
AAEL022814-PA
AAEL022843-PA
AAEL022959-PA
AAEL023008-PA
AAEL023191-PA
A AFL 023224-PA
ΔΔΕΙ 023269-ΡΔ
ΔΔΕΙ 023293-ΡΔ
AAEL0232/3-1A A AEL 0232/3 DA
AAEL0233434 A A AEL 023453 DA
AAEL023433-1 A
AAEL022005-FA
AAELU23030-MA
AAELU238U3-PA
AAELU23912-PA
AAELU24005-PA
AAEL024392-PA
AAEL024397-PA
AAEL024542-PA
AAEL024574-PA
AAEL024783-PA
AAEL025056-PA
AAEL025121-PA
AAEL025148-PA
AAEL025292-PA
AAEL025302-PA
AAEL025430-PA
AAEL025482-PA
AAEL025599-PA
AAEL025751-PA
AAEL025791-PA
AAEL025828-PA
AAEL025875-PA
AAEL026148-PA
AAEL026152-PA
AAEL026178-PA
AAEL026206-PA
AAEL026212-PA
AAEL026250-PA
AAEL026317-PA
AAEL026505-PA
AAEL026515-PA
AAEL026533-PA
AAEL026686-PA
AAEL026772-PA

Anexo 12: Lista de histonas H2A encontradas em A. aegypti. Continuação

AAEL026786-PA
AAEL026854-PA
AAEL026947-PA
AAEL027168-PA
AAEL027306-PA
AAEL027480-PA
AAEL027513-PA
AAEL027645-PA
AAEL027969-PA
AAEL028217-PA

Anexo 12: Lista de histonas H2A encontradas em A. aegypti. Continuação

Anexo 13: Lista de proteínas de HR encontradas em A. aegypti.

Proteínas da via de HR	A. aegypti
NBN	AAEL023570-PA
	AAEL014377-PA
	AAEL014377-PB
MRE11	AAEL023601-PA
RAD50	AAEL011772-PA
	AAEL005245-PB
	AAEL026871-PA
	AAEL020323-PA
	AAEL021668-PA
	AAEL025895-PA
	AAEL021133-PA
BRCA1	Х
RBBP8 (CtIP)	Х
SIRT6	AAEL011473-PB
DSS1 (SEM1)	Х
CCNA2	AAEL000672-PA
CCNA1	Х
CDK2	AAEL012339-PC
	AAEL023423-PA
EXO1	AAEL006209-PA
DNA2	AAEL000201-PB
	AAEL000201-PC
	AAEL000201-PD
	AAEL000201-PE
BLM	AAEL004039-PA
WRN	AAEL025042-PA
	AAEL025042-PB
	AAEL026343-PA
BRIP1	X
RPA1	AAEL012826-PA
RPA2	AAEL014250-PA

RPA3	AAEL007291-PA
PPP4C	AAEL004040-PA
PPP4R2	AAEL001129-PA
RAD51	AAEL006080-PA
BRCA2	AAEL014774-PA
PALB2	Х
RAD51AP1	Х
RAD51B	Х
RAD51C	AAEL011307-PA
RAD51D	AAEL015060-PA
XRCC2	Х
XRCC3	AAEL027245-PA
	AAEL005399-PA
RAD54L	AAEL002647-PA
RAD54B	AAEL002341-PB
PCNA	AAEL012545-PA
RFC1	AAEL001324-PB
RFC2	AAEL020929-PA
RFC3	AAEL007581-PA
	AAEL024947-PA
RFC4	AAEL006788-PA
RFC5	AAEL009465-PA
POLE	AAEL002800-PA
POLE2	AAEL002785-PA
POLE3	AAEL001764-PA
POLE4	AAEL010085-PA
POLD1	AAEL027722-PA
POLD2	AAEL007541-PB
	AAEL007541-PA
POLD3	AAEL003935-PA
POLD4	Х
POLK	Х
POLH	AAEL004562-PA
EME1	AAEL009999-PA
EME2	Х
MUS81	AAEL011993-PA
	AAEL011993-PB
	AAEL011993-PC
SLX1	AAEL018312-PA
	AAEL018312-PB
SLX4	Х
TOP3A	AAEL007683-PA
RMI1	AAEL007058-PA
RMI2	Х
SPIDR	X

Anexo 13: Lista de proteínas de HR encontradas em A. aegypti. Continuação

CEN1	A A EL 000425 PA
RTFL 1	AAEL000425-IA
PIF1	AAEL0000000 TA
MCM2	AAEL017100 TA
MCM3	ΔΔΕΙ 011811-PΔ
MCM4	X
MCM5	A A EL 002810-PA
MCM6	AAEL002010-1 A
MCM7	AAEL012340-1A
	X
ADI 1	A A EL 008777 DB
ADLI	AAEL008777-PC
	ΔΔFI 008777-PD
	AAEL008777-PE
SMC5	A A EL 010013 DB
SMC6	AAEL010913-FD
NSMCE2	AALLUU2301-FA
Drotaínas da via da UD	AAEL001425-PA
NDN	A. <i>degypti</i>
INBIN	AAEL023570-PA
	AAEL014577-PA
MDE11	AAELUI43//-FD
MREII	AAEL023601-PA
RAD50	AAEL011//2-PA
	AAEL005245-PB
	AAEL0208/1-PA
	AAEL020525-PA
	AAEL021008-FA
	ΔΔΕΙ 021133-ΡΔ
	AAEE021133-1A
BRCAI	X
RBBP8 (CtIP)	X
SIRT6	AAEL011473-PB
DSS1 (SEM1)	X
CCNA2	AAEL000672-PA
CCNA1	Х
CDK2	AAEL012339-PC
	AAEL023423-PA
EXO1	AAEL006209-PA
DNA2	AAEL000201-PB
	AAEL000201-PC
	AAEL000201-PD
	AAEL000201-PE
BLM	AAEL004039-PA
WRN	AAEL025042-PA
	AAEL025042-PB
	AAEL026343-PA

Anexo 13: Lista de proteínas de HR encontradas em A. aegypti. Continuação

BRIP1	Х
RPA1	AAEL012826-PA
RPA2	AAEL014250-PA
RPA3	AAEL007291-PA
PPP4C	AAEL004040-PA

Anexo 13: Lista de proteínas de HR encontradas em A. aegypti. Continuação

Anexo 14: Lista de proteínas de NHEJ encontradas em A. aegypti.

Proteínas da via de NHEJ	A. aegypti
KU80 (XRCC5)	AAEL003684-PA
KU70 (XRCC6)	AAEL019404-PA
	AAEL019404-PB
DNAPKCS (PRKDC)	AAEL024736-PA
Artemis (DCLRE1C)	AAEL026758-PA
APLF	AAEL011254-PA
	AAEL011254-PB
	AAEL011254-PC
	AAEL011254-PD
	AAEL011254-PE
	AAEL011254-PF
	AAEL011254-PG
	AAEL011254-PH
APTX	AAEL014945-PB
	AAEL014945-PC
	AAEL014945-PD
PNKP	AAEL025882-PA
TDP1	AAEL011629-PB
	AAEL011629-PC
TDP2	Х
POLM	Х
POLL	Х
TDT	Х
XRCC4	Х
XLF (NHEJ1)	AAEL021206-PA
LIG4	AAEL021495-PA

Proteínas da via de MMR	A. aegypti
MSH2	AAEL027688-PA
MSH3	X
MSH6	AAEL011780-PA
MLH1	AAEL005858-PA
MLH3	X
PMS2	AAEL026487-PA
	AAEL026487-PB
PCNA	AAEL012545-PA
RFC1	AAEL001324-PB
RFC2	AAEL020929-PA
RFC3	AAEL007581-PA
	AAEL024947-PA
RFC4	AAEL006788-PA
RFC5	AAEL009465-PA
EXO1	AAEL006209-PA
RPA1	AAEL012826-PA
RPA2	AAEL007291-PA
RPA3	AAEL014250-PA
POLD1	AAEL027722-PA
POLD2	AAEL007541-PB
	AAEL007541-PA
POLD3	AAEL003935-PA
POLD4	X
LIG1	AAEL017566-PB
	AAEL017566-PC

Anexo 15: Lista de proteínas de MMR encontradas em A. aegypti.

\_\_\_\_

Proteínas da via de BER	A. aegypti
SMUG	AAEL013286-PC
UNG	Х
MPG	Х
MUTYH	Х
MBD4	X
TDG	Х
OGG1	AAEL013179-PA
	AAEL008148-PA
	AAEL008148-PB
NTH	AAEL003906-PA
NEIL1	Х
NEIL2	Х
NEIL3	X
APTX	AAEL014945-PB
	AAEL014945-PC
	AAEL014945-PD
TDP1	AAEL011629-PB
	AAEL011629-PC
PNKP	AAEL025882-PA
APE1	AAEL010781-PA
	AAEL010781-PB
APE2	Х
HMGB1	AAEL011414-PE
	AAEL011414-PF
POLL	Х
POLB	Х
PARP1	AAEL011815-PA
PARP2	Х
XRCC1	AAEL002782-PB
LIG3	Х
PCNA	AAEL012545-PA
RFC1	AAEL001324-PB
RFC2	AAEL020929-PA
RFC3	AAEL007581-PA
	AAEL024947-PA
RFC4	AAEL006788-PA
RFC5	AAEL009465-PA
RPA1	AAEL012826-PA
RPA2	AAEL014250-PA
RPA3	AAEL007291-PA
FEN1	AAEL005870-PB
POLE	AAEL002800-PA
POLE2	AAEL002785-PA
POLE3	AAEL001764-PA

Anexo 16: Lista de proteínas de BER encontradas em A. aegypti.

POLE4	AAEL010085-PA
POLD1	AAEL027722-PA
POLD2	AAEL007541-PB
	AAEL007541-PA
POLD3	AAEL003935-PA
POLD4	Х
LIG1	AAEL017566-PB
	AAEL017566-PC

Anexo 16: Lista de proteínas de BER encontradas em A. aegypti. Continuação.

Anexo 17: Lista de proteínas de NER encontradas em A. aegypti.

Proteínas da via de NER	A. aegypti
XPC	AAEL003897-PB
	AAEL003893-PA
	AAEL018259-PB
	AAEL003868-PA
RAD23A	Х
RAD23B	AAEL002077-PA
CETN2	Х
RBX1	AAEL004691-PA
	AAEL004691-PB
CUL4A	AAEL003466-PC
	AAEL003466-PD
	AAEL003466-PE
	AAEL003466-PF
	AAEL003466-PG
	AAEL003466-PH
	AAEL003466-PI
	AAEL003466-PJ
	AAEL003466-PK
CUL4B	Х
DDB1	AAEL002407-PB
DDB2	Х
INO80	AAEL012355-PB
INO80B	AAEL014237-PA
INO80C	AAEL001805-PA
INO80D	AAEL025976-PA
	AAEL025976-PB
	AAEL025976-PC
INO80E	AAEL002139-PA
ACTL6A	AAEL011317-PA
ACTR5	AAEL002822-PA
ACTR8	AAEL010762-PA
	AAEL010762-PB
NFRKB	AAEL022135-PB
MCRS1	AAEL000594-PA

TFPT	Х
RUVBL1	AAEL004686-PA
YY1	AAEL022478-PA
	AAEL022478-PB
GPS1	AAEL021784-PA
COPS2	AAEL005730-PA
COPS3	AAEL002271-PA
COPS4	AAEL001874-PA
COPS5	AAEL022505-PA
COPS6	AAEL014282-PA
COPS7A	Х
COPS7B	AAEL000635-PA
	AAEL000635-PC
COPS8	AAEL007821-PA
PARP1	AAEL011815-PA
PARP2	Х
POLR2A	AAEL017363-PA
POLR2B	AAEL017156-PA
POLR2C	AAEL008755-PA
POLR2D	AAEL006661-PA
POLR2E	AAEL011087-PA
POLR2F	AAEL003552-PA
POLR2G	AAEL003401-PA
POLR2H	AAEL000677-PA
POLR2I	AAEL001831-PA
POLR2J	AAEL013700-PA
POLR2L	AAEL014831-PA
XAB2	AAEL025600-PA
PRPF19	AAEL015199-PB
PPIE	AAEL007273-PA
AQR	AAEL019447-PA
ZNF830	Х
ISY1	AAEL007203-PA
EP300	AAEL017391-PA
	AAEL017391-PB
	AAEL017391-PC
	AAEL01/391-PD
	AAEL01/391-PE
	AAELUI/391-PF AAEL017301 DC
	AALLOI/391-FU
UBA52	AAEL006511-PA
UBB	AAEL003888-PA
	AAEL003888-PC
UBC9	AAEL025779-PA
	AAEL02/903-PA

Anexo 17: Lista de proteínas de NER encontradas em A. aegypti. Continuação.

RPS27AAAEL013536-PB AAEL013536-PC AAEL013536-PDERCC6 (CSB)XERCC8 (CSA)XUVSSAXUSP7AAEL019825-PA AAEL019825-PD AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PA AAEL019825-PFHMGN1XCDK7AAEL00138-PAMNAT1AAEL013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL01325-PAXPB (ERCC3)AAEL012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PA AAEL012523-PAGTF2H2AAEL012750-PA AAEL012523-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4 AAEL01057-PA AAEL01057-PARPA1 RPA1 RAAEL012826-PARPA2 RPA3 CHDIL AAEL003968-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PB	UBE2I	Х
AAEL013536-PC AAEL013536-PDERCC6 (CSB)XUVSSAXUSP7AAEL019825-PA AAEL019825-PB AAEL019825-PC AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001038-PAMNAT1AAEL0013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL0013205-PA AAEL013248-PGXPD (ERCC2)AAEL012750-PA AAEL0125524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL0125524-RAGTF2H3AAEL012523-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL011057-PA AAEL012523-PARPA1AAEL012826-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL011057-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL011057-PA AAEL012826-PARPA1AAEL012826-PA AAEL014250-PARPA1AAEL014250-PA AAEL014250-PA AAEL014250-PASUMO1X	RPS27A	AAEL013536-PB
AAEL013536-PDERCC6 (CSB)XERCC8 (CSA)XUVSSAXUSP7AAEL019825-PA AAEL019825-PB AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL0013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PFAAEL013248-PF AAEL013248-PFXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL013205-PAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H4AAEL012750-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL0106356-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL012826-PARPA1AAEL012826-PARPA1AAEL012826-PAGTF2H5AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL012826-PAGTF2H5AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA3AAEL007291-PACHDILAAEL003968-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PASUMO1X		AAEL013536-PC
ERCC6 (CSB)XERCC8 (CSA)XUVSSAXUSP7AAEL019825-PA AAEL019825-PB AAEL019825-PC AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL0013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL00404-RA AAEL0125524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL01057-PA AAEL010556-PAGTF2H4AAEL010570-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL010756-PAGTF2H5AAEL010756-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL010756-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL0109792-PAXPAAAEL01003968-PARPA1AAEL007291-PARPA3AAEL004716-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PASUMO1X		AAEL013536-PD
ERCC8 (CSA)XUVSSAXUSP7AAEL019825-PA AAEL019825-PB AAEL019825-PC AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL0013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PFCCNHAAEL013205-PAXPD (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL0012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL01057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PA AAEL014250-PARPA3AAEL004716-PBSUMO1X	ERCC6 (CSB)	Х
UVSSAXUSP7AAEL019825-PA AAEL019825-PB AAEL019825-PC AAEL019825-PC AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL00138-PAMNAT1AAEL0013248-PE AAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL0012750-PA AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012523-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL011057-PA AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL007291-PA AAEL003968-PA AAEL004716-PBSUMO1X	ERCC8 (CSA)	Х
USP7 AAEL019825-PA AAEL019825-PB AAEL019825-PD AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PF MMGN1 X TCEA1 AAEL001496-PA AAEL001496-PB CDK7 AAEL001038-PA MNAT1 AAEL008850-PA CCNH AAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PF AAEL013248-PG XPB (ERCC3) AAEL013205-PA XPD (ERCC2) AAEL00404-RA AAEL025524-RA GTF2H1 AAEL012750-PA AAEL012750-PB GTF2H2 AAEL012750-PA GTF2H4 AAEL012523-PA GTF2H4 AAEL006356-PA GTF2H5 AAEL01057-PA AAEL0107056-PA GTF2H4 AAEL012523-PA RPA1 AAEL012826-PA RPA2 AAEL012826-PA RPA3 AAEL007291-PA CHD1L AAEL003968-PA AAEL004716-PB SUMO1 X	UVSSA	Х
AAEL019825-PBAAEL019825-PCAAEL019825-PDAAEL019825-PEAAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PAAAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PEAAEL013248-PFAAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RAAAEL025524-RAGTF2H1AAEL012750-PAAAEL012750-PAAAEL012750-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL007291-PARPA3AAEL007291-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X	USP7	AAEL019825-PA
AAEL019825-PC AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RA AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H2AAEL007056-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL007291-PARPA3AAEL007291-PA AAEL004716-PBSUMO1X		AAEL019825-PB
AAEL019825-PD AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL00404-RA AAEL012750-PAGTF2H1AAEL012750-PBGTF2H2AAEL007056-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL007291-PAAAEL007291-PAAAEL004716-PASUMO1X		AAEL019825-PC
AAEL019825-PE AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001038-PACDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RA AAEL025524-RAGTF2H1AAEL012750-PBGTF2H2AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PA AAEL004716-PBSUMO1X		AAEL019825-PD
AAEL019825-PFHMGN1XTCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PE AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL0044-RA AAEL0125524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H2AAEL0122523-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL0106356-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PA AAEL004716-PBSUMO1X		AAEL019825-PE
HMGN1         X           TCEA1         AAEL001496-PA AAEL001496-PB           CDK7         AAEL001038-PA           MNAT1         AAEL008850-PA           CCNH         AAEL013248-PE AAEL013248-PF           AAEL013248-PG         XPB (ERCC3)           XPB (ERCC2)         AAEL00404-RA AAEL025524-RA           GTF2H1         AAEL012750-PA AAEL012750-PB           GTF2H2         AAEL007056-PA           GTF2H3         AAEL019792-PA           GTF2H5         AAEL011057-PA           RPA1         AAEL012826-PA           RPA2         AAEL014250-PA           RPA3         AAEL007291-PA           CHD1L         AAEL003968-PA           AAEL004716-PB         SUMO1		AAEL019825-PF
TCEA1AAEL001496-PA AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RA AAEL025524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H2AAEL007056-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL0106356-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PA AAEL004716-PBSUMO1X	HMGN1	X
AAEL001496-PBCDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PEAAEL013248-PFAAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RAAAEL025524-RAGTF2H1GTF2H1AAEL012750-PBGTF2H2AAEL007056-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PBSUMO1SUMO1X	TCEA1	AAEL001496-PA
CDK7AAEL001038-PAMNAT1AAEL008850-PACCNHAAEL013248-PEAAEL013248-PFAAEL013248-PFAAEL013248-PGXPB (ERCC3)XPB (ERCC2)AAEL000404-RAAAEL025524-RAAAEL012750-PAGTF2H1AAEL012750-PAGTF2H2AAEL007056-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL003968-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X		AAEL001496-PB
MNAT1         AAEL008850-PA           CCNH         AAEL013248-PE           AAEL013248-PF         AAEL013248-PG           XPB (ERCC3)         AAEL013205-PA           XPD (ERCC2)         AAEL000404-RA           AAEL025524-RA         GTF2H1           GTF2H1         AAEL012750-PA           GTF2H2         AAEL007056-PA           GTF2H3         AAEL012523-PA           GTF2H4         AAEL006356-PA           GTF2H5         AAEL019792-PA           XPA         AAEL011057-PA           RPA1         AAEL012826-PA           RPA2         AAEL0014250-PA           RPA3         AAEL003968-PA           AAEL004716-PB         SUMO1	CDK7	AAEL001038-PA
CCNHAAEL013248-PE AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RA AAEL025524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H2AAEL007056-PAGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL011057-PA AAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL003968-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PBSUMO1X	MNAT1	AAEL008850-PA
AAEL013248-PF AAEL013248-PGXPB (ERCC3)AAEL013205-PAXPD (ERCC2)AAEL000404-RA AAEL025524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H2AAEL012750-PBGTF2H3AAEL007056-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PA AAEL004716-PBSUMO1X	CCNH	AAEL013248-PE
AAEL013248-PG           XPB (ERCC3)         AAEL013205-PA           XPD (ERCC2)         AAEL000404-RA           AAEL025524-RA         AAEL012750-PA           GTF2H1         AAEL012750-PB           GTF2H2         AAEL007056-PA           GTF2H3         AAEL012523-PA           GTF2H4         AAEL006356-PA           GTF2H5         AAEL019792-PA           XPA         AAEL011057-PA           RPA1         AAEL012826-PA           RPA2         AAEL0014250-PA           RPA3         AAEL003968-PA           AAEL004716-PA         AAEL004716-PB           SUMO1         X		AAEL013248-PF
XPB (ERCC3)         AAEL013205-PA           XPD (ERCC2)         AAEL000404-RA           AAEL025524-RA         AAEL012750-PA           GTF2H1         AAEL012750-PB           GTF2H2         AAEL007056-PA           GTF2H3         AAEL012523-PA           GTF2H4         AAEL006356-PA           GTF2H5         AAEL019792-PA           XPA         AAEL011057-PA           RPA1         AAEL012826-PA           RPA2         AAEL007291-PA           CHD1L         AAEL003968-PA           AAEL004716-PB         SUMO1		AAEL013248-PG
AAEL01200 FAXPD (ERCC2)AAEL000404-RA AAEL025524-RAGTF2H1AAEL012750-PA AAEL012750-PBGTF2H2AAEL012750-PBGTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PA AAEL004716-PBSUMO1X	XPB (ERCC3)	AAEL013205-PA
ATELCOULATELCOURCELAAEL012750-PAGTF2H1AAEL012750-PBGTF2H2GTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4GTF2H5AAEL0106356-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPARPA1RPA2RPA3CHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PBSUMO1X	XPD (ERCC2)	AAEL000404-RA
GTF2H1       AAEL012750-PA         AAEL012750-PB         GTF2H2       AAEL007056-PA         GTF2H3       AAEL012523-PA         GTF2H4       AAEL006356-PA         GTF2H5       AAEL019792-PA         XPA       AAEL011057-PA         RPA1       AAEL012826-PA         RPA2       AAEL014250-PA         CHD1L       AAEL003968-PA         AAEL004716-PB       SUMO1		AAEL025524-RA
AAEL012750-PBGTF2H2AAEL012750-PBGTF2H3AAEL007056-PAGTF2H4AAEL012523-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PBSUMO1X	GTF2H1	AAEL012750-PA
GTF2H2         AAEL007056-PA           GTF2H3         AAEL012523-PA           GTF2H4         AAEL006356-PA           GTF2H5         AAEL019792-PA           XPA         AAEL011057-PA           RPA1         AAEL012826-PA           RPA2         AAEL014250-PA           CHD1L         AAEL003968-PA           AAEL004716-PA         AAEL004716-PB           SUMO1         X		AAEL012750-PB
GTF2H3AAEL012523-PAGTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PASUMO1X	GTF2H2	AAEL007056-PA
GTF2H4AAEL006356-PAGTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X	GTF2H3	AAEL012523-PA
GTF2H5AAEL019792-PAXPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PASUMO1X	GTF2H4	AAEL006356-PA
XPAAAEL011057-PARPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X	GTF2H5	AAEL019792-PA
RPA1AAEL012826-PARPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X	XPA	AAEL011057-PA
RPA2AAEL014250-PARPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X	RPA1	AAEL012826-PA
RPA3AAEL007291-PACHD1LAAEL003968-PAAAEL004716-PAAAEL004716-PBSUMO1X	RPA2	AAEL014250-PA
CHD1L AAEL003968-PA AAEL004716-PA AAEL004716-PB SUMO1 X	RPA3	AAEL007291-PA
AAEL004716-PA AAEL004716-PB SUMO1 X	CHD1L	AAEL003968-PA
AAEL004716-PB SUMO1 X		AAEL004716-PA
SUMO1 X		AAEL004716-PB
	SUMO1	Х
SUMO2 X	SUMO2	X
SUMO3 AAEL015064-PB	SUMO3	AAEL015064-PB
PIAS1 AAEL015099-PE	PIAS1	AAEL015099-PE
AAEL015099-PF		AAEL015099-PF
PIAS3 X	PIAS3	Х
RNF111 X	RNF111	Х
UBE2N AAEL014642-PB	UBE2N	AAEL014642-PB
UBE2V2 AAEL011873-PA	UBE2V2	AAEL011873-PA

Anexo 17: Lista de proteínas de NER encontradas em A. aegypti. Continuação.

ERCC1	AAEL022595-PA
XPF (ERCC4)	AAEL002098-PA
XPG (ERCC5)	AAEL026470-PA
	AAEL026470-PB
USP45	AAEL018212-PA
PCNA	AAEL012545-PA
RFC1	AAEL001324-PB
RFC2	AAEL020929-PA
RFC3	AAEL007581-PA
	AAEL024947-PA
RFC4	AAEL006788-PA
RFC5	AAEL009465-PA
POLD1	AAEL027722-PA
POLD2	AAEL007541-PB
	AAEL007541-PA
POLD3	AAEL003935-PA
POLD4	Х
POLE	AAEL002800-PA
POLE2	AAEL002785-PA
POLE3	AAEL001764-PA
POLE4	AAEL010085-PA
POLK	Х
POLR2K	AAEL017317-PB
XRCC1	AAEL002782-PB
LIG1	AAEL017566-PB
	AAEL017566-PC
LIG3	Х
ELL	AAEL006035-PB
	AAEL006035-PC
	AAEL006035-PD
	AAEL006035-PE
	AAEL006035-PF
	AAEL006035-PG
	AAELUU6035-PH
	AAELUU0U33-PI
	AAELUUUUUUUU AAELUUUUUUUUUUU
	$\Delta \Delta FI 006035-PK$
	A A EL 006035-PM
	7 M 112000033-1 1VI

Anexo 17: Lista de proteínas de NER encontradas em A. aegypti. Continuação.