

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de ciências biológicas
Departamento de genética, ecologia e evolução
Programa de pós-graduação em genética

Verônica Santana da Silva

**GENES DE RECOMBINAÇÃO ENVOLVIDOS NO REPARO DO DNA E NA
REPRODUÇÃO SEXUADA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.**

Belo Horizonte
2022

Verônica Santana da Silva

**GENES DE RECOMBINAÇÃO ENVOLVIDOS NO REPARO DO DNA E NA
REPRODUÇÃO SEXUADA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.**

Versão final

Tese de Doutorado submetida ao Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Genética.

Orientador: Carlos Renato Machado

Coorientadora: Mariana Torquato
Quezado de Magalhães

Belo Horizonte

2022

043

Silva, Verônica Santana da.

Genes de recombinação envolvidos no reparo do DNA e na reprodução sexuada de *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Verônica Santana da Silva. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado. Coorientador: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães.

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

1. Genética. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Reprodução. 4. Recombinação Homóloga. 5. Meiose. I. Machado, Carlos Renato. II. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"GENES DE RECOMBINAÇÃO ENVOLVIDOS NO REPARO DO DNA E NA REPRODUÇÃO SEXUADA de *Trypanosoma cruzi*"

Verônica Santana da Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Carlos Renato Machado - Orientador
UFMG

Francisco Pereira Lobo
UFMG

Lucas Bleicher
UFMG

Fernando Alvarez-Valin
Universidad de la República de Uruguay

Gonzalo German Cabrera Vallejos
Universidad de Chile

Belo Horizonte, 19 de abril de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Bleicher, Professor do Magistério Superior**, em 19/04/2022, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gonzalo Germán Cabrera Vallejos, Usuário Externo**, em 19/04/2022, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Fernando Alvarez Valin, Usuário Externo**, em 19/04/2022, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Renato Machado, Chefe**, em 19/04/2022, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo, Professor do Magistério Superior**, em 19/04/2022, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1396517** e o código CRC **8C8CD1A6**.

Dedico esta tese aos donos dos gametas que me originaram:
aos meus progenitores e sempre amigos (meus pais).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Biológicas – ICB pela estrutura física fornecida para a realização deste trabalho. Ao programa de Pós-Graduação em Genética, em especial à secretária **Raíssa Campos**, por sempre sanar os nossos problemas de maneira cordial e eficiente. Agradeço às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço ao meu orientador, Dr. **Carlos Renato Machado**, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com um organismo modelo, de características peculiares, que nos intriga a cada descoberta, nos faz pensar o “impensável” e que diante do espanto nos ensina o quanto ainda temos por aprender. Obrigada professor, pela orientação, pelas ideias, discussões e por sua curiosidade entusiástica diante dos resultados, sempre nos instigando a ir atrás de respostas. Sou grata por esses anos e por ter contribuído de forma significativa para a minha formação.

Agradeço também à minha coorientadora Dra. **Mariana Quezado**, que de forma bem atípica entrou na minha história e fez morada. Obrigada por me proporcionar “lentes novas” e por me mostrar das mais variadas formas possíveis que no final tudo dá certo. Agradeço por todo o tempo dispensado (e põe tempo nisso), pelas conversas científicas e não científicas, por abrir as portas do seu laboratório e me acolher em momentos “difíceis”. Gratidão pelo apoio científico, moral e psicológico. Obrigada pela amizade “tch Mary”. Sou extremamente grata por me apresentar o mundo sob a ótica estrutural, por me fazer pensar diferente e repensar os meus próprios questionamentos. Ah e não posso deixar de agradecer também pelos momentos de descontração, regados a pizza, jogos, sorrisos e tudo mais que um laboratório de pesquisa também deve ter. Obrigada por tornar a minha jornada mais leve!

Gostaria de agradecer também aos professores do Laboratório de Genética Bioquímica -LGB, **Glória Franco, Andrea Macedo e Erich Birelli** pela boa convivência proporcionada no dia a dia, pelas críticas e sugestões ao meu trabalho, sempre bem colocadas e por incentivarem o meu desenvolvimento profissional.

Em especial, agradeço ao professor **Erich**, por ter me dado apoio científico e pessoal durante esses anos. Obrigada por estar na bancada conosco e vivenciar a nossa realidade enquanto alunos. Sou agradecida por não medir esforços em tentar me ajudar quando um experimento não dava certo e pela preocupação com o meu bem-estar físico e emocional quando eu precisava ficar até tarde no lab. Ao Erich e família, obrigada por torcerem e vibrarem pelas minhas conquistas. Gratidão pela amizade.

Agradeço aos professores colaboradores, que emprestaram seus laboratórios e equipamentos possibilitando a conclusão deste trabalho. À profa Dra. **Hélida Andrade** (Dept. de Parasitologia/UFMG), pelas incontáveis vezes que usei os seus aposentos para revelar membranas de *western*. Obrigada por serem tão gentis comigo e me proporcionarem um ambiente acolhedor. Agradeço também pelas conversas e pelo maravilhoso cheiro de café. Ao prof Dr. **Luís Franco** (Dept. de Bioquímica e Imunologia/UFMG), grata pela ajuda em momento crucial com o equipamento de transferência de *western*. Muito obrigada pela confiança. Ao prof Dr. **Ronaldo Nagem** (Dept. de Bioquímica e Imunologia/UFMG), pelos equipamentos, orientações e conselhos sobre clonagem e expressão de proteínas. Agradeço também à profa Dra. **Luciana Andrade** (Dept. de Morfologia/UFMG), por ter disponibilizado o seu espaço e o microscópio de fluorescência para que eu pudesse usar, inclusive aos finais de semana. Ao prof Dr. **Stenio Fragoso** e a Dra. **Priscila Hiraiwa** (ICC-Fiocruz/PR), pelos experimentos de citometria realizados. Ao prof Dr. **Richard McCulloch** (Dept. Parasitologia/ Universidade de Glasgow-UK) pelo anticorpo anti-yH2A fornecido.

Agradeço às técnicas **Adriana Raabe** (Lab. de Proteômica/UFMG) e **Renata Peixoto** (NAGE/UFMG) por me socorrerem em vários momentos, pela leveza das conversas, por me animarem e me darem palavras de força em meio ao “caos”. Obrigada!

Também sou grata a todos os colegas e amigos do LGB, com os quais tive a oportunidade de conviver diariamente durante toda essa jornada. A todos que por lá passaram e contribuíram para a existência de um clima alegre e amistoso no laboratório. Grata aos que por muitas vezes me fizeram ter crises de riso, sendo um “respiro” nas adversidades cotidianas, em especial a **Dani de Laet, Jéssica Caroline e Lorrane Diniz**. À **Dani Chame** obrigada pela força e pelo “*coaching*” científico de sempre. Gratidão!

Obrigada aos alunos do grupo de reparo, **Wesley, Amanda, Adalberto, Willian, Bruno Repolês, Bruno Resende e Hélida Marina**, por compartilharmos ideias, por discutirmos projetos, pelas palavras de conforto, sugestões e ajuda com a parte prática quando necessário. Grata principalmente pelos devaneios sobre assuntos acadêmicos e não acadêmicos. Gostaria de agradecer de maneira especial ao **Bruno Repolês** por ter me dado um suporte científico nos últimos meses, me ajudando a construir e organizar pensamentos. Repolho, obrigada pela amizade, pelas discussões filosóficas sobre a vida e por me provocar risos.

Também agradeço aos alunos e professores do Laboratório de Biofísica de Macromoléculas - LBM e Laboratório de Venenos e Toxinas de Animais - LVTA, sempre muito prestativos, simpáticos, receptivos e legais comigo. Foi bom partilhar momentos com vocês. Agradeço em especial ao **Bruno Marques**, por ter me dado suporte na parte de bioinformática, por me fazer gostar do Linux e pela paciência com a minha total inabilidade computacional.

Aos meus queridos amigos que contrariando as localizações geográficas ou não, sempre se fizeram presentes e torceram por mim. Seja por mensagens, ligações, vídeos ou pensamentos, a presença e a torcida de vocês nessa jornada foram fundamentais e sou muito grata. **Érica**, obrigada pela amizade e apoio ao longo desses “longos” anos, por entender o meu cronograma acadêmico quando tentávamos planejar algo e ao mesmo tempo por me fazer lembrar das férias e da simplicidade de outrora quando andávamos sem maiores preocupações. Amigo **Thalles** (Platy), sou muito grata por tê-lo em minha vida, obrigada pela parceria de sempre, pelas conversas, conselhos e sentimentos acadêmicos compartilhados. **Joyce**, obrigada por ter feito parte dessa minha jornada na UFMG, com seu jeito tranquilo de ser conseguia me tirar reflexões e muitas gargalhadas. Obrigada pela amizade e pela companhia nos “bailes” da vida.

Ao “Raparigas do meu coração”, semeado em Ribeirão (do tempo) e disperso pelos mares da vida, expresso toda a minha gratidão e afeto. Obrigada por me inspirarem como mulheres, mães, filhas, amigas, cientistas, profissionais e acima de tudo como ser humano. Obrigada **Van, Gabi, Kari e Mirna** pelo apoio de sempre. Saudades de apreciar o pôr-do-sol com vocês meninas!!

À **Vanessa Muller e família**, fica o meu eterno agradecimento. Obrigada Van, por ter me dado abrigo, afeto, colo, broncas, comidas que abraçam o estômago e aquecem o coração, por me fazer refletir sobre coisas da vida, por saber que sou friorenta e se preocupar com isso, por compartilhar suas roupas comigo, pela atenção e cuidado mesmo à distância. Obrigada pelas risadas, pelos momentos, pelas pedaladas, por me fazer conhecer praias incríveis, por ter me dado uma sobrinha linda, pelos sábios conselhos (inclusive os acadêmicos) e por caminhar junto comigo nessa e em outras jornadas. Gratidão Vanzoca. Amo vocês!

Sou grata também aos meus irmãos **João Carlos, Gisele Oliveira e Matheus Santana** por estarem comigo em momentos importantes me dando suporte e deixando tudo bem mais leve, tal como nossa infância. Obrigada por terem me dado sobrinhos lindos e maravilhosos que encham o meu coração de alegria. Toppo, muito agradecida pela parceria de anos, por ter me emprestado o “tufão” em momento especial. Foi uma mão na roda! Obrigada também pelo investimento a mim direcionado. Gratidão “little” brother.

Por último e não menos importante gostaria de deixar o meu agradecimento aos meus pais **José Alves e Mariene Santana**, que nunca pouparam esforços para realizar os meus objetivos, muitas vezes abdicando de suas próprias necessidades. Gratidão por terem me dado a graça de viver, por cuidarem de mim com todo amor e proteção, por me instruírem no caminho lícito em meio a um mundo caótico, onde o ter vale mais que o ser. Obrigada por me ensinarem a olhar o mundo com olhos esperançosos de dias melhores (♫ Tempos Modernos ♫). Obrigada pelo apoio emocional, espiritual, psicológico, financeiro e por entenderem

minhas escolhas profissionais. Gratidão família, pela base e suporte incondicionais. Amo vocês!

Aos amigos beija-flores que me acompanharam na escrita desta tese, fazendo-me perceber que a vida é mais simples e colorida do que a gente “pinta”.

Obrigada Senhor por ter me conduzido até aqui.

“A lâmpada do corpo são os olhos. Se os teus
olhos forem bons, todo o teu corpo terá luz”.
Mtt.6,22.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, organismo modelo estudado neste trabalho, apresenta uma elevada diversidade genética intraespecífica que reflete na sua plasticidade fenotípica encontrada nos diferentes hospedeiros. A existência de células naturalmente híbridas e os eventos de recombinação genética observados neste parasito, juntamente com a observação de genes específicos de meiose em seu genoma, tem gerado questionamentos quanto a sua forma de reprodução exclusivamente clonal. Neste trabalho estudamos alguns genes envolvidos em processos de recombinação, como DMC1, RAD51 e ATM. Após obtenção dos parasitos de *T. cruzi* modificados, analisamos a resposta fenotípica das células quando submetidas a 500Gy de radiação gama e a diferentes agentes genotóxicos como MMS e HU, ambos capazes de gerar quebras na molécula de DNA. Foi observado que células deficientes para atividade cinase de ATM mostraram-se mais sensíveis a radiação e ao MMS do que as células selvagens (CL Brener). Através da expressão de mRNAs dos genes analisados, e ensaios de cinética da histona H2A fosforilada, principal marcador de DSB em eucariotos, mostramos aqui que parece haver uma co-regulação entre a cinase ATM e as recombinases DMC1 e RAD51 de *T. cruzi*, específicas da recombinação homóloga. Por ensaios de formação de híbridos, utilizando o corante CellTrace, mostramos pela primeira vez que células de *T. cruzi* ao superexpressarem o gene de recombinação meiótica (DMC1) se tornaram mais aptas ao processo de fusão celular, evidenciando assim, uma possível relação da meiose com eventos de fusão citoplasmática nesse parasito. Fundamentados por análises de biologia estrutural, mostramos que a proteína TcDMC1 parece apresentar elevada semelhança funcional com a recombinase meiótica humana. Fato este que corrobora a elevada taxa de formação de híbridos observados em células de *T. cruzi* superexpressoras de DMC1. Diante dos resultados observados ao longo deste trabalho, podemos sugerir que DMC1 assim como em outros organismos, possivelmente também está envolvido em processos de recombinação meiótica em *Trypanosoma cruzi*, o que evidencia uma possível reprodução sexuada neste parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, reprodução sexuada, recombinação homóloga, meiose

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the model organism studied in this work, has a high intraspecific genetic diversity which reflects on its phenotypic plasticity found in different hosts. The existence of naturally hybrid cells and the genetic recombination events observed in this parasite, besides the observation of specific meiosis genes in its genome, have raised questions about its exclusively clonal reproduction. In the present work we studied some genes involved in recombination processes, such as DMC1, RAD51 and ATM. After obtaining the modified *T. cruzi* parasites, we analyzed the phenotypic response of the cells when subjected to 500Gy of gamma radiation and to different genotoxic agents such as MMS and HU, both capable of generating DNA breaks. It was observed that cells deficient in ATM kinase activity were more sensitive to radiation and MMS than wild-type cells (CL Brener). Through expression of mRNAs of the genes analyzed, and by kinetic assays of phosphorylated histone H2A, the main marker of DSB in eukaryotes, we showed that there seems to be a co-regulation between ATM kinase and the specific *T. cruzi* DMC1 and RAD51 recombinases of homologous recombination. In assays to measure hybrid formation, using CellTrace dye, we showed, for the first time, that *T. cruzi* cells overexpressing the meiotic recombination gene (DMC1) became more apt for the cell fusion process. Based on structural biology analyses, we showed that the TcDMC1 protein seems have a high functional similarity to the human meiotic recombinase. This fact corroborates the high rate of hybrid formation observed in *T. cruzi* cells overexpressing DMC1. In view of the results observed throughout this work, we can suggest that DMC1, as in other organisms, is possibly also involved in meiotic recombination processes in *Trypanosoma cruzi*, which evidences a possible sexual reproduction in this parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, sexual reproduction, homologous recombination, meiosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- VIAS DE REPARO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA.....	31
FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS INTERAÇÕES DOS FILAMENTOS PRÉ-SINÁPTICOS DE RAD51 E DMC1 COM A MOLÉCULA DE DNA NA PRESENÇA DE BASES MAL PAREADAS..	35
FIGURA 3- SIMPLIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE PROTEÍNAS MEIÓTICAS E SUA DISTRIBUIÇÃO NAS PRINCIPAIS LINHAGENS DE EUKARIOTOS.	37
FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> ..	38
FIGURA 5 - ESQUEMA DA DEPLEÇÃO DE ATM EM T.CRUZI.	41
FIGURA 6 - CURVAS DE CRESCIMENTO DE T.CRUZI SUPEREXPRESSORES DE RAD51 IRRADIADOS..	42
FIGURA 7- ESQUEMA DE CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO PROCKGFPNEO ENVIADO PARA SÍNTESE COMERCIAL.	47
FIGURA 8 - FÓRMULA ESTRUTURAL DOS AGENTES QUÍMICOS METIL METANO SULFONATO E HIDROXIUREIA, UTILIZADOS NO TRABALHO	50
FIGURA 9 - CONFIRMAÇÃO DE CÉLULAS SUPEREXPRESSORAS DE DMC1 POR PCR CONVENCIONAL.	60
FIGURA 10 - CONFIRMAÇÃO DE CÉLULAS SUPEREXPRESSORAS DE DMC1 POR RTqPCR.	61
FIGURA 11 - CONFIRMAÇÃO DE CÉLULAS SUPEREXPRESSORAS DE RAD51 POR RTqPCR.....	62
FIGURA 12 - CONFIRMAÇÃO DE CÉLULAS DE T.CRUZI HEMINOCAUTES PARA ATM POR RTqPCR	63
FIGURA 13 - CURVAS DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS DE T. CRUZI MODIFICADAS	64
FIGURA 14 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE T. CRUZI SUPERDMC1 E ATM+/- IRRADIADAS COM 500GY DE RADIAÇÃO GAMA	66
FIGURA 15 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE T. CRUZI ATM+/- TRATADAS COM MMS E HU.....	67
FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE YH2A FOSFORILADA NAS CEPAS DM28C E CL BRENER DE T. CRUZI.....	69
FIGURA 17 - EXPRESSÃO DE YH2A FOSFORILADA EM T.CRUZI SUPEREXPRESSOR DE DMC1.....	70
FIGURA 18 - EXPRESSÃO DE YH2A FOSFORILADA EM T.CRUZI HEMINOCAUTES PARA RAD51 ...	71
FIGURA 19 - EXPRESSÃO DE YH2A FOSFORILADA EM T.CRUZI HEMINOCAUTES PARA A ATIVIDADE CINASE DE ATM.....	72

FIGURA 20 - EXPRESSÃO DO TRANSCRITO DE DMC1 EM CEPAS HÍBRIDA E NÃO HÍBRIDA DE TRYPANOSOMA CRUZI.	73
FIGURA 21 - EXPRESSÃO DO TRANSCRITO DE DMC1 EM TRYPANOSOMA CRUZI MODIFICADOS. ..	75
FIGURA 22 - EXPRESSÃO DO TRANSCRITO DE RAD51 EM CÉLULAS DE TRYPANOSOMA CRUZI MODIFICADAS.	77
FIGURA 23 - EXPRESSÃO DO TRANSCRITO DE ATM EM CÉLULAS DE TRYPANOSOMA CRUZI MODIFICADAS.....	80
FIGURA 24 - EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM CÉLULAS DE TRYPANOSOMA CRUZI IRRADIADAS.	81
FIGURA 25 - VISUALIZAÇÕES DE CÉLULAS HÍBRIDAS DE TRYPANOSOMA CRUZI.....	84
FIGURA 26 - FORMAÇÃO DE HÍBRIDOS EM T.CRUZI DM28C MODIFICADOS E SELVAGENS.	84
FIGURA 27 - ANÁLISE DE CÉLULAS HÍBRIDAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.	86
FIGURA 28 - FORMAÇÃO DE HÍBRIDOS EM T.CRUZI CL BRENER MODIFICADOS E SELVAGENS.....	87
FIGURA 29 -VISUALIZAÇÕES DE CÉLULAS HÍBRIDAS DE TRYPANOSOMA CRUZI APÓS DIFERENTES TEMPOS DE MISTURA.	89
FIGURA 30 - CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE HÍBRIDOS EM CÉLULAS DE TRYPANOSOMA CRUZI MODIFICADAS.....	90
FIGURA 31 - EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DE MEIOSE HOP2 E MND1 EM CÉLULAS DE TRYPANOSOMA CRUZI MODIFICADAS.....	92
FIGURA 32 - ALINHAMENTO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A DMC1.....	94
FIGURA 33 - ALINHAMENTO DE ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS PROTEÍNAS ENTRE HSDMC1 E TcDMC1.	96
FIGURA 34 - ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DAS REGIÕES L1 E L2 DAS RECOMBINASES DMC1 E RAD51.....	98
FIGURA 35 - COMPARAÇÃO DA IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA DAS REGIÕES L1 E L2 DAS RECOMBINASES DMC1 E RAD51 DE HUMANO E DE T. CRUZI.	99
FIGURA 36 - MODELO TRIDIMENSIONAL DO MONÔMERO TcDMC1.	100
FIGURA 37 - ANÁLISE DOS ÂNGULOS PHI E PSI DO MODELO TEÓRICO DE TcDMC1.....	101
FIGURA 38 - ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTER-RESIDUAIS DO MODELO TEÓRICO DE TcDMC1. .	102
FIGURA 39 - COMPARAÇÃO ENTRE O MODELO TRIDIMENSIONAL DA RECOMBINASE MEIÓTICA DMC1 DE TRYPANOSOMA CRUZI E DMC1 DE HUMANO, COM DESTAQUE PARA AS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE ALFA HÉLICE E FOLHA BETA.	104
FIGURA 40 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE AS REGIÕES L1 E L2 DE TcDMC1 E HSDMC1 (1V5W).....	105
FIGURA 41 - POSSÍVEIS INTERFACES DE INTERAÇÃO ENTRE OS MONÔMEROS DE TcDMC1.....	106
FIGURA 42 - MODELO TRIDIMENSIONAL DO MONÔMERO TcRAD51.	107

FIGURA 43 - ANÁLISE DOS ÂNGULOS PHI E PSI DO MODELO TEÓRICO DE TcRAD51.	108
FIGURA 44 - ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTER-RESIDUAIS DO MODELO TEÓRICO DE TcRAD51.	109
FIGURA 45 - COMPARAÇÃO ENTRE O MODELO TRIDIMENSIONAL DE RAD51 DE TRYPANOSOMA CRUZI E DE HUMANO (5JZC), COM DESTAQUE PARA AS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE ALFA HÉLICE E FOLH BETA.	110
FIGURA 46 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE AS REGIÕES DE LOOP1 E LOOP2 DE TcRAD51 E HsRAD51 (5JZC)..	111
FIGURA 47 - INTERFACES DE INTERAÇÃO ENTRE OS MONÔMEROS DE TcRAD51.	112
FIGURA 48 - DOCKING MOLECULAR DO MODELO TcDMC1 COM ssDNA.....	115
FIGURA 49 - DOCKING MOLECULAR DO MODELO TcRAD51 COM ssDNA	117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR CONVENCIONAL.....	48
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE RT QPCR.....	54
TABELA 3 - VALORES DE INTERAÇÃO GERADOS PELO HADDOCK PARA O RE-DOCKING REALIZADO	58
TABELA 4 - COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS MODELOS TcDMC1 E TcRAD51 GERADOS PELO ALPHA FOLD E PELO MODELLER.	113
TABELA 5 - VALORES DE INTERAÇÃO GERADOS PELO HADDOCK PARA A ANCORAGEM MOLECULAR DE TcDMC1 COM SSDNA.	114
TABELA 6 - VALORES DE INTERAÇÃO GERADOS PELO HADDOCK PARA A ANCORAGEM MOLECULAR DE TcRAD51 COM SSDNA.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4 PP	Fotoprodutos 6-4
ADExTA	<i>Analysis of DNA Exchange by Thymidine Analogs</i>
AP	Apurínico/Apirimidínico
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Related</i>
BER	Reparo por Excisão de Base
BLM	<i>Bloom syndrome protein</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA Complementar
Chk1	Cinase de Checkpoint 1
Chk2	Cinase de Checkpoint 2
CPD	Dímero de Ciclobutano Pirimidina
CPT	Camptotecina
CtIP	Proteína de interação a CtBP
DDR	Resposta ao dano de DNA (<i>DNA damage response</i>)
DMC1	Recombinase meiótica de DNA 1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-PKc	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	Quebra de Fita Dupla no DNA
DTT	Ditiotreitol
DTU	Unidade Discreta de Tipagem
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HOP1	Proteína de pareamento homólogo 1
HOP2	Proteína de pareamento homólogo 2
HR	Recombinação Homóloga
HU	Hidroxiuréia
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	Meio de Cultura <i>Liver Infusion Tryptose</i>
MER3	Helicase dependente de ATP
MMR	Reparo por Mau Pareamento
MMS	Metil Metano Sulfonato
MND1	Proteína de divisão nuclear meiótica 1
MRN	Complexo Mre11-Rad50-Nbs1
MSH4	Proteína homóloga a MultS 4

MSH5	Proteína homóloga a MultS 5
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeo
NHEJ	Junção das Extremidades Não Homólogas
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PIKK	Cinase relacionada a cinase 3- fosfatidilinositol
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno
RAD51	Proteína RAD51 de reparo a DNA
REC8	Proteína de recombinação - separação de cromátides irmãs e cromossomos homólogos
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	Proteína de Replicação A
RT-qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SPO11	Proteína de recombinação meiótica
ssDNA	DNA de Fita Simples
TAE	Tampão Tris Acetato EDTA
TBST	Tampão Tris Salino com Tween 20
TLS	Síntese translesão
UTR	Região Não Traduzida
UV	Luz Ultravioleta
WT	Tipo selvagem (Wild Type)
ZIP1	Proteína de recombinação transportadora de zinco 1
ZIP4	Proteína de recombinação transportadora de zinco 4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. SURGIMENTO DOS EUCARIOTOS E O INÍCIO DA REPRODUÇÃO SEXUADA	20
1.2. DANOS NO DNA E OS DIFERENTES SISTEMAS DE REPARO	24
1.3. A CINASE ATM E SEU PAPEL NA DDR	25
1.4. REPARO DE DNA POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA E SEU PAPEL NA MEIOSE	26
1.4.1. <i>Recombinação homóloga – HR</i>	27
1.4.2. <i>As recombinases RAD51 e DMC1</i>	31
1.4.3. <i>Genes e proteínas específicas de meiose</i>	35
1.5. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DOENÇA DE CHAGAS	37
1.5.1. <i>Recombinação homóloga em T. cruzi</i>	40
2. OBJETIVOS	45
2.1. OBJETIVO GERAL	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. LINHAGENS DO PARASITO E CULTIVO DE CÉLULAS	46
3.2. CONSTRUÇÃO DOS PARASITOS MODIFICADOS	46
3.3. INICIADORES UTILIZADOS PARA SELECIONAR OS PARASITOS	47
3.4. TRANSFEÇÃO E SELEÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	48
3.5. RADIAÇÃO GAMA	49
3.6. METIL METANO SULFONATO (MMS) E HIDROXIURÉIA (HU)	49
3.7. ANÁLISE DE YH2A FOSFORILADA - WESTERN BLOT	50
3.7.1. <i>Extração e quantificação de proteínas</i>	50
3.7.2. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE</i>	51
3.7.3. <i>ImunoBlotting</i>	51
3.8. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONFIRMAÇÃO DOS SUPEREXPRESSORES – RT-qPCR	52
3.8.1. <i>Extração de RNA</i>	52
3.8.2. <i>Síntese de cDNA</i>	53
3.8.3. <i>PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)</i>	53
3.9. ENSAIO DE FUSÃO CITOPLASMÁTICA UTILIZANDO CELL TRACE TM ASSAY	54
3.9.1. <i>Imunofluorescência: Montagem e análise das lâminas – Cell Trace</i>	55
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
3.11. ANÁLISES DE BIOLOGIA ESTRUTURAL	55
3.11.1. <i>Modelagem comparativa</i>	55
3.11.2. <i>Docking Molecular</i>	57
4. RESULTADOS	59
4.1. CONFIRMAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>T. CRUZI</i> GENETICAMENTE MODIFICADAS	59
4.2. ESTUDO DE FENÓTIPOS DOS PARASITAS MODIFICADOS	63
4.3. CINÉTICA DE REPARO A DSB ALTERADA EM CÉLULAS DE <i>T. CRUZI</i> MODIFICADAS	67
4.4. EXPRESSÃO DE DMC1 ELEVADA EM CÉLULAS DE <i>T. CRUZI</i> SELVAGEM E HEMINOCUTES PARA RAD51 E ATM	72
4.5. EXPRESSÃO DE RAD51 É ALTERADA EM CÉLULAS ATM+/-	76
4.6. EXPRESSÃO DE ATM ELEVADA EM CÉLULAS SUPERDMC1 E REDUZIDA EM CÉLULAS MODIFICADAS PARA RAD51	78
4.7. AUMENTO NA EXPRESSÃO DE DMC1 E REDUÇÃO DE ATM EM CÉLULAS DE <i>T. CRUZI</i> IRRADIADAS	80
4.8. A SUPEREXPRESSÃO DE DMC1 AUMENTA OS EVENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO EM <i>T. CRUZI</i>	82
4.8.1. <i>Análise da cinética de formação de híbridos em células superDMC1 e superRAD51</i>	87
4.9. EXPRESSÃO DO GENE DE MEIOSE HOP2 NÃO É ALTERADA NAS CÉLULAS SUPERDMC1 E ATM+/- , DIFERENTE DA EXPRESSÃO DE MND1	91

4.10.	COMPARAÇÕES ESTRUTURAIS ENTRE AS RECOMBINASES DE <i>T. CRUZI</i> E DE HUMANO REVELAM POSSÍVEIS SEMELHANÇAS DE FUNÇÃO.....	93
4.10.1.	<i>TcDMC1 e sua semelhança estrutural com a proteína meiótica humana</i>	99
4.10.2.	<i>Conservação estrutural entre TcRAD51 e HsRAD51</i>	106
4.11.	DOCKING DE TcDMC1 COM ssDNA: A RECOMBINASE MEIÓTICA DE <i>T. CRUZI</i> INTERAGE COM O DNA DE FORMA SEMELHANTE A HSDMC1	113
4.12.	DOCKING DE TcRAD51 COM ssDNA: INTERAÇÃO DE TcRAD51 COM DNA DIFERE DA HsRAD51	115
5.	DISCUSSÃO	118
6.	CONCLUSÃO	134
7.	REFERÊNCIAS.....	135
8.	APÊNDICES.....	155
8.1.	APÊNDICE A - CONFIRMAÇÃO DE CÉLULAS ATM+/- POR SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO DE <i>T. CRUZI</i>	155
8.2.	APÊNDICE B - CÉLULAS ATM+/- TRATADAS COM MMS E ANALISADAS EM 24H E 48H	157
8.3.	APÊNDICE C - IMAGENS DOS HÍBRIDOS SUPERDMC1 X SUPERDMC1.....	158
8.4.	APÊNDICE D - IDENTIDADE DA PROTEÍNA TcDMC1 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	160
8.5.	APÊNDICE E - TENTATIVA DE CLONAGEM DMC1 NO PET28ATEV	162
8.6.	APÊNDICE F - TROCAS GENÉTICAS EM <i>T. CRUZI</i> - <i>ADEXTA</i>	167
8.7.	APÊNDICE G - RNASEQ PARA GENES DE MEIOSE EM <i>T. CRUZI</i> IRRADIADO.....	168
8.8.	APÊNDICE H - ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	169
8.9.	APÊNDICE I - ARTIGO SUBMETIDO AGUARDANDO REVISÃO.....	170
9.	ANEXOS	171
9.1.	ANEXO 1 - MAPA DO VETOR PGEM®-T EASY (PROMEGA)	171
9.2.	ANEXO 2 - MAPA DO VETOR PET28ATEV	172

1. INTRODUÇÃO

1.1. Surgimento dos eucariotos e o início da reprodução sexuada

Os seres vivos são classificados em três grandes domínios (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990): Archea, Bacteria e Eukarya, sendo que os organismos dos domínios Archea e Bacteria se diferenciam por serem procariotos, sem organelas citoplasmáticas e sem envelope nuclear (CAVALIER-SMITH, 1998).

O processo de surgimento dos primeiros eucariotos (eucariogênese), ainda não foi completamente elucidado pela ciência (ADL et al., 2012; GRAY, 2017). Os estudiosos em evolução apresentam diversos modelos (LÓPEZ-GARCÍA; MOREIRA, 2015) sendo que o mais aceito atualmente é o modelo simbiogênico, onde provavelmente uma célula hospedeira do grupo das Archeas incorporou uma alphaproteobacteria (ancestral das mitocôndrias) por meio de endossimbiose, dando origem ao que seriam as primeiras células eucarióticas (LÓPEZ-GARCÍA; MOREIRA, 2020; MARGULIS, 1996). O sequenciamento dos primeiros genomas de Archea e o conhecimento sobre a maquinaria de transcrição desses organismos revelam que muitos genes envolvidos no processamento de informações são mais parecidos com genes de eucariotos do que com genes de bactérias (SPANG et al., 2015), sugerindo uma possível aproximação evolutiva entre eucariotos e archea.

Para Sagan e Margulis (1987), a existência de eventos de canibalismo entre organismos procariotos que habitavam a Terra primitiva, deu origem aos processos de trocas genéticas entre os indivíduos. Em períodos de estresse (variações de Ph, salinidade e disponibilidade de nutrientes), as células podem ter fagocitado umas às outras, propiciando a fusão de cariótipos e possíveis trocas gênicas, tornando-se uma vantagem adaptativa ao longo das gerações, por aumentar a variabilidade genética das células canibais (SAGAN; MARGULIS, 1987). O aumento do repertório genético nas células primitivas, propiciado por eventos de recombinação gênica entre os organismos, culminaria evolutivamente na reprodução sexuada, mecanismo este exclusivo de eucariotos.

No que envolve o processo de recombinação genética, os organismos apresentam diferentes mecanismos. As bactérias, por exemplo, apresentam três mecanismos pelos quais podem adquirir DNA exógeno e recombinar seu material genético: conjugação, mediada por plasmídeo, transdução, causada por vírus que infectam bactérias, conhecidos como fagos e a transformação que envolve a captura de DNA exógeno via recombinação homóloga (HR).

As bactérias realizam trocas de material genético entre si para reparar o DNA, eliminar mutações desfavoráveis em condições de estresse e combater genomas parasitas (AMBUR et al., 2016; JOHNSBORG; ELDHOLM; HÅVARSTEIN, 2007). Todos esses mecanismos de recombinação, contribuem com o processo de transferência gênica horizontal em procariotos, tendo papel fundamental na ecologia e evolução bacteriana, influenciando no hábitat, na alimentação, na defesa e na sua virulência atuando como patógenos (AMBUR et al., 2016; OCHMAN; LAWRENCE; GROLSMAN, 2000).

O período de transição entre células protoeucarióticas até o último ancestral comum dos eucariotos (*LECA*, do inglês *Last Eukaryotic Common Ancestor*) foi rodeado pela existência de diferentes processos de conservação, modificações, reconfiguração gênica pré-existentes através de eventos de mutação, transferência gênica horizontal¹ (HGT, do inglês, *horizontal gene transfer*), endossimbiose e seleção (GOODENOUGH; HEITMAN, 2014). As trocas genéticas e a recombinação entre os protoeucariotos podem ter sido vantajosas e ter favorecido a evolução da reprodução sexuada por aumentar o potencial adaptativo das células. Porém, apesar dos mecanismos que promovem as trocas entre o material genético de diferentes bactérias serem bem desenvolvidos, o fato da reprodução sexuada não ser um evento frequente nas populações naturais, sugere que os mecanismos de trocas genéticas evoluíram de maneira independente do processo de recombinação meiótica, encontrado apenas em eucariotos (CHARLESWORTH, 1989).

Há indícios de que a reprodução sexuada surgiu na Terra há pelo menos 1 bilhão de anos, quando os ancestrais dos eucariotos começaram a trocar material genético entre si, através da fusão de células especializadas na reprodução (gametas) produzidas por meiose (BUTTERFIELD, 2000; GIBSON et al., 2018).

Quando se trata de reprodução sexuada, pelo menos duas características fundamentais devem ser levadas em consideração: existência de recombinação através da troca de informação genética entre dois cromossomos homólogos; os cromossomos participantes são geralmente de dois indivíduos diferentes (BERNSTEIN et al., 1984; BERNSTEIN; BERNSTEIN; MICHOD, 2017). Dentre as possíveis hipóteses dos mecanismos moleculares que teriam dado início a este tipo de reprodução, estão os mecanismos de reparo ao DNA, (BERNSTEIN et al., 1984; BERNSTEIN; BERNSTEIN; MICHOD, 2017; CHARLESWORTH, 1989; LONG; MICHOD, 1995; MICHOD; LEVIN, 1988), onde especificamente o reparo a dano oxidativo teria sido o principal agente direcionador da

¹ A transferência horizontal gênica é a troca de material genético entre células ou genomas de espécies não relacionadas, ocorrendo em procariotos através da conjugação, transdução e, principalmente, a transformação (Brown, 2003)

evolução meiótica (HÖRANDL; HADACEK, 2013; HÖRANDL; SPEIJER, 2018), tendo o oxigênio molecular papel relevante nesse processo.

Sabe-se que a quantidade de oxigênio na atmosfera terrestre atingiu a concentração próxima dos 21% (concentração de O₂ atual) há apenas 500 milhões de anos (BEKKER et al., 2004; BERNER et al., 2003; CARVER, 1981). Os níveis de oxigênio elevados na atmosfera permitiram a formação da camada de ozônio que culminou no surgimento de vida aeróbica (HESSEN, 2008). Além de conferir um ambiente oxigenado aos organismos primitivos, a camada de ozônio também conferiu uma certa proteção contra os raios ultravioleta (UV), os quais possuem poder energético suficientes para modificar ligações químicas e consequentemente alterar a estrutura de biomoléculas podendo causar danos em ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; HIDE; JANSEN; STRID, 2013). No entanto, as altas concentrações de oxigênio na atmosfera e a utilização deste no metabolismo celular de alguns organismos colocaram as células primitivas diante de novos agentes causadores de dano como as espécies reativas de oxigênio, (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) liberadas como subprodutos do metabolismo celular aeróbico (ex: radical ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (·OH)) (APEL; HIRT, 2004). Conhecidos como os principais agentes endógenos causadores de danos no DNA, as ROS podem causar modificações de bases por oxidação que se não reparadas podem resultar em quebras de fita simples (SSB, do inglês *single strand break*), quebras duplas (DSB, do inglês *double strand break*), formar adutos e *crosslinkers* no DNA (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012). Apesar das ROS possuírem uma meia vida curta, elas são capazes de iniciar reações de oxidação em cadeia que podem ser letais a célula (HÖRANDL; SPEIJER, 2018).

Os primeiros organismos provavelmente foram selecionados por um ambiente altamente oxidativo, e os que conseguiram aprimorar seus mecanismos de defesa contornando os danos causados pelas ROS, seja através da síntese de pigmentos antioxidantes e/ou através dos diferentes mecanismos de reparo de DNA, mantiveram sua história ao longo da evolução (CARLETTI; NERVO; CATTIVELLI, 2014; HESSEN, 2008). Indivíduos acostumados a lidar com estresse, podem apresentar uma aumento nas taxas de mutações (GOHO; BELL, 2000; HALL, 1992; P. L. FOSTER, 1999) e elevadas taxas de quebras duplas (DSB) no DNA como resultado de diversas tentativas de lidar com o ambiente estressor (AGRAWAL; HADANY; OTTO, 2005). Os que conseguiam recombinar seu material genético danificado com outros indivíduos, possivelmente adquiriram vantagens adaptativas, aumentando suas chances de sobrevivência.

Sabe-se que os danos no DNA provocados pela radiação, induzem mecanismos de reparo que envolvem recombinação genética e o fato de algumas enzimas da recombinação estarem presentes também na reprodução sexuada encontrada na maioria dos eucariotos atuais, reforça ainda mais a ideia do surgimento do sexo como um mecanismo de lidar com mutações e alterações no material genético (ROTHSCHILD, 1999).

Em eucariotos existem algumas evidências de que o processo de recombinação pode ser estimulado por danos no DNA. No trabalho de Bernstein e Johns (1989) é possível observar a relação entre reparo e reprodução sexuada em leveduras. Formas vegetativas de *Schizosaccharomyces pombe* que foram expostas a H_2O_2 , apresentaram um aumento na mudança para formas reprodutivas sexuais de até 8 vezes depois de expostas ao dano, sugerindo uma relação entre dano no DNA e reprodução sexuada em eucariotos (BERNSTEIN; JOHNS, 1989; ROTHSCHILD, 1999). Outro exemplo de processo sexual recombinacional em eucariotos acontece com a alga verde *Volvox carteri*, onde a reprodução pode ser induzida por choque térmico (KIRK; KIRK, 1986) e inibida por anti-oxidantes, indicando que a indução da reprodução sexuada nesses organismos pode ser mediada por estresse oxidativo (NEDELCO; MICHOD, 2003). Esses achados sustentam a ideia de que danos no DNA provocados por ROS, podem de fato induzir recombinação meiótica em eucariotos.

Por meio de análises filogenéticas utilizando o fator de alongação 1 alfa (EF-1 alfa, do inglês *Elongation factor 1 alpha*), proteína envolvida na maquinaria de tradução altamente conservada em eucariotos, Dacks e Roger (1999) propuseram a existência de uma reprodução sexuada primordial e facultativa no ancestral comum dos eucariotos. Desde então, foram relatados indícios desta reprodução em diversos microorganismos eucarióticos patogênicos que acreditava-se serem assexuados (LAHR et al., 2011; MALIK et al., 2008), sugerindo assim que a reprodução sexuada meiótica seria uma característica básica de eucariotos.

Essa ideia é reforçada ao analisar geneticamente os protozoários *Trichomonas vaginalis* e *Giardia intestinalis* (syn. *Lamblia*), organismos descendentes de uma linhagem que divergiu muito cedo na evolução e que apresentam genes específicos de meiose (MALIK et al., 2008; RAMESH; MALIK; AND JOHN M. LOGSDON, 2005). Evidências de ciclos sexuais em outras espécies antes consideradas assexuadas como indivíduos do gênero *Leishmania* (AKOPYANTS et al., 2009) e o passado ancestral sexuado das amebas (LAHR et al., 2011) tem apontado para existência de uma reprodução críptica nos diferentes organismos (HEITMAN, 2010; RAMÍREZ et al., 2012).

De forma geral, os indivíduos podem ser classificados como organismos de reprodução assexuada (clonal, por divisões mitóticas), parassexuada (recombinação não meiótica com redução de ploidia, encontrada em alguns eucariotos unicelulares) (MISHRA; FORCHE; ANDERSON, 2021; PONTECORVO; ROPER; FORBES, 1953), sexuada (recombinação meiótica) ou facultativa. A reprodução facultativa ainda é uma característica presente em vários organismos (DACKS; ROGER, 1999; OTTO, 2009), desde plantas que podem se reproduzir tanto por polinização cruzada, autopolinização ou reprodução vegetativa (HOLSINGER, 2000) até alguns invertebrados (SUOMALAINEN, 1962) como as abelhas da espécie *Apis mellífera capensis*, que podem se reproduzir tanto de forma sexuada como também por partenogênese² (BOOTH et al., 2012). Já a maioria dos eucariotos unicelulares se reproduzem principalmente de forma assexuada, podendo se reproduzirem de forma sexuada ocasionalmente (TIBAYRENC et al., 1991). Esses organismos de reprodução facultativa possuem a capacidade de trocar entre os tipos de reprodução sexuada e assexuada a depender das condições de cada indivíduo e do meio em que se encontram (RAM; HADANY, 2016).

1.2. Danos no DNA e os diferentes sistemas de reparo

O material genético de todos os organismos, o qual guarda as informações necessárias a replicação celular, funcionamento do metabolismo basal e perpetuação das espécies, sempre esteve sujeito a diversos tipos de danos endógenos e exógenos ao longo da evolução. No entanto, as células desenvolveram mecanismos rápidos e precisos de sinalização e reparo do DNA, garantindo assim a integridade genômica geração após geração (HOEIJMAKERS, 2001, 2009).

As principais vias de reparo ao dano no DNA são: **a)** via de reparo por excisão de base (**BER**, do inglês *base excision repair*), responsável pelo reconhecimento e reparo de bases modificadas por oxidação, deaminação, alquilação, atuando também em sítios abásicos; **b)** via de reparo por excisão de nucleotídeo (**NER**, do inglês *nucleotide excision repair*), utilizada no reconhecimento e na remoção de lesões que alteram a estrutura da dupla hélice de DNA, como os danos estruturais do tipo CPD e 6-4 fotoprodutos oriundos da radiação UV, e agentes que causam um dano físico ao DNA como benzopireno e agentes quimioterápicos.; **c)** via de reparo de mau pareamento (**MMR**, do inglês *mismatch repair*), uma via pós-replicativa evolutivamente conservada e que contribui com a fidelidade da replicação em pelo menos cem vezes (ARANA; KUNKEL, 2010). A via de mau pareamento, reconhece e repara

² tipo de reprodução assexuada; sem fecundação; reprodução natural, ou provocada, a partir de um óvulo não fecundado; agamia.

inserções, deleções e incorporações errôneas de base nitrogenada durante a replicação do DNA. Já para o reparo de quebras de fita dupla (DSB), existem duas vias principais: **d)** via de junção de extremidades não-homólogas (**NHEJ**, do inglês *non-homologous end joining*), a qual reconhece e liga extremidades de DNA fita dupla quebradas; **e)** via de reparo por recombinação homóloga (**HRR**, do inglês *homologous recombination repair*), a qual é ativa apenas na fase de replicação do ciclo celular, onde a partir de uma fita molde, a maquinaria proteica consegue restituir a integridade genômica de forma fiel, reparando as quebras. A parada da maquinaria de replicação também pode ativar vias de resposta ao dano por gerar quebras duplas e instabilidade genômica nas células, (CICCIA; ELLEDGE, 2010).

As vias de reparo podem ser ativadas em diferentes estágios do ciclo celular possibilitando as células repararem os danos de forma bem regulada através de uma maquinaria de sinalização. Os mecanismos de resposta ao dano no DNA (DDR, do inglês *DNA Damage Response*) incluem as vias de reparo, processos de tolerância ao dano (síntese translesão) e ativação dos *checkpoints* do ciclo celular (GIGLIA-MARI; ZOTTER; VERMEULEN, 2011) caracterizando-se por utilizar moléculas que desempenham papéis de sensores, transdutores e efetores. Os sensores são responsáveis por detectarem a lesão e sinalizarem para os transdutores, que amplificam o sinal recrutando proteínas efetoras (JOAQUIN; FERNANDEZ-CAPETILLO, 2012; MCGOWAN; RUSSELL, 2004). Uma vez que o dano é percebido pelos sensores, algumas proteínas cinases funcionam como principais transdutoras de sinas, sendo elas ATM, ATR e DNA-PK, pertencentes a família PIKK (cinase relacionada a cinase 3-fosfatidilinositol). São proteínas grandes com estruturas similares e domínios bem conservados. Essas três cinases são capazes de fosforilar especificamente resíduos de serina e treonina geralmente seguidos de uma glutamina. Após ativação dessas cinases, elas tonam-se aptas a fosforilarem centenas de substratos regulando diversas funções na célula (ALHMOUD et al., 2020; CICCIA; ELLEDGE, 2010; JOAQUIN; FERNANDEZ-CAPETILLO, 2012).

1.3. A cinase ATM e seu papel na DDR

Como principal cinase recrutada durante eventos de quebras duplas no DNA, a ausência da proteína ATM ou da sua atividade cinase, é responsável pela desordem neurológica autossômica recessiva denominada Ataxia Telangiectasia (A -T), cujo gene recebeu o nome de Ataxia Telangiectasia Mutado (ATM, do inglês, *Ataxia telangiectasia mutated*). Pacientes portadores da mutação apresentam neurodegeneração cerebelar progressiva, predisposição ao câncer, imunodeficiência, sensibilidade a radiação ionizante, resistência à insulina, envelhecimento precoce e déficit de crescimento, sendo assim

caracterizada como uma doença multisistêmica. (BHATTI et al., 2011; WEITERING et al., 2021).

A cinase ATM assim como as outras proteínas da família PIKK, possui uma arquitetura bioquímica bem conservada, com múltiplos domínios proteicos. Em humanos, a proteína é composta por 3056 aminoácidos, com os domínios de repetição HEAT e FAT (FRAP-ATM-TRRAP) na região N-terminal, os quais funcionam como superfície de interação proteína-proteína. Na porção C-terminal encontra-se o domínio cinase, localizado entre os domínios PRD (PIKK Regulatory-Domain) e FATC (FAT-C terminal). (WEITERING et al., 2021; WILLIAMS; ZHANG, 2021). A proteína ATM encontra-se inativa na sua forma de dímero, sendo dissociada em monômeros após ativação, onde adquire a funcionalidade de uma cinase sendo capaz de fosforilar outras proteínas e a si mesma (BAKKENIST; KASTAN, 2003; GOODARZI; LEES-MILLER, 2004), contribuindo de forma significativa na resposta a DSB.

ATM é ativada através de modificações pós-traducionais e de interações com outras proteínas como com o complexo MRN, o qual recruta ATM para os sítios de DSB. A porção C-terminal da subunidade Nbs1 de MRN, interage diretamente com regiões específicas de ATM, tendo papel relevante na sua ativação como cinase (LEE; PAULL, 2007). Modificações como acetilação no domínio PRD (SUN et al., 2009) e eventos de autofosforilação nas serinas 367, 1893, 1981, e 2996 (KOZLOV et al., 2006, 2011) também são exemplos de processos responsáveis pela ativação da função cinase de ATM. Uma vez ativada, ATM é capaz de fosforilar diversos substratos como as proteínas p53, PALB2, RAD51, CHK2 e a histona H2AX, envolvidas nos mais variados processos (WILLIAMS; ZHANG, 2021). Através de diferentes vias de sinalização, a proteína tem papel também na regulação do ciclo celular e em eventos de apoptose, atuando no checkpoint G1/S pela ativação de p53 e CHK2, dentre outros substratos (WEITERING et al., 2021), sendo de fundamental importância na sinalização do dano a DSB em eucariotos.

1.4. Reparo de DNA por Recombinação Homóloga e seu papel na meiose

As quebras de fita dupla do DNA são as lesões com maior potencial de letalidade e mutação (WARD, 1994) podendo acontecer naturalmente nas células durante a parada da forquilha de replicação e durante alguns processos específicos como a recombinação V(D)J envolvendo rearranjo somático de genes, recombinação *class-switch* que ocorre nas imunoglobulinas e durante a recombinação meiótica (HARTLERODE; SCULLY, 2009). No entanto, as DSBs também podem ser formadas a partir de agentes físico-químicos externos às células. As drogas quimioterápicas que incluem agentes alquilantes (MMS-

metilmetanosulfonato e TMZ- temozolomida), agentes causadores de crosslink (mitomicina C e cisplatina), compostos radiomiméticos (bleomicina e fleomicina) (CHEN; STUBBE, 2005), inibidores de topoisomerasas que induzem quebras de fita simples (camptotecina) e dupla (etoposídeo), drogas que causam bloqueio na forquilha de replicação (hidroxiureia e afidilcolina) e a radiação ionizante (IR) que compreende os raios-x e os raios gama muito utilizados na radioterapia (MEHTA; HABER, 2014), são todos exemplos de agentes externos capazes de causar DSBs.

Dentre os agentes alquilantes muito utilizado em ensaios genotóxicos está o MMS, capaz de metilar DNA de fita simples e dupla. As bases modificadas por ele formam adutos como N3-metilimina, N1-metiladenina, N3-metiladenina, N7-metiladenina, N3-metil-citosina, N1-metilguanina, N3-metilguanina e N7-metilguanina, os quais bloqueiam a síntese de DNA durante a replicação, podendo gerar quebras de fitas simples e duplas na molécula (WYATT; PITTMAN, 2006). Outro agente capaz de causar quebras na molécula de DNA, é a hidroxiureia, um antineoplásico e antiviral bastante utilizado em tratamentos oncológicos, doenças infecciosas e dermatológica. A hidroxiureia inibe a síntese de DNA por provocar depleção no *pool* de nucleotídeos durante a replicação celular. A droga inibe a enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pela formação dos desoxiribonucleotídeos, o que acaba por gerar parada da replicação podendo levar a quebras do DNA (AKERBLOM et al., 1981; MEHTA; HABER, 2014; SINGH; XU, 2016).

Um agente exógeno de grande potencial de letalidade, é a radiação ionizante, que além de causar diretamente quebras simples e duplas na molécula de DNA, pode ainda causar modificações de base, como oxidação, alquilação, deaminação e perda de bases gerando sítios apurínicos ou apurimidínicos (AP), que também geram quebras (DALY et al., 2004, 2010; KAVANAGH et al., 2012; PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). Para lidar com esses danos, as células desenvolveram pelo menos quatro vias independentes capazes de reparar as DSBs: a via NHEJ clássica, uma via NHEJ alternativa mediada por micro-homologia (alt-NHEJ ou MMEJ), a via de anelamento por fita simples (SSA) e a via de reparo por recombinação homóloga (HR) (KELSO et al., 2017), que será abordada em detalhes neste tópico.

1.4.1. Recombinação homóloga – HR

Alguns autores dividem didaticamente a via HR em três estágios, mais conhecidos como: reconhecimento, processamento e resolução (HARTLERODE; SCULLY, 2009) ou pré-sináptico, sináptico e pós-sináptico (LIU et al., 2011). A recombinação homóloga pode atuar

no reparo a DSBs através de diferentes mecanismos, dentre os quais dependem de reconhecimento e pareamento das extremidades de DNA quebradas com sequências homólogas intactas, seja na cromátide irmã, no cromossomo homólogo ou até mesmo em regiões homólogas externas ao genoma (KROGH; SYMINGTON, 2004). Para que a HR aconteça, é necessário a participação de várias proteínas (LIU et al., 2011; PIAZZA; HEYER, 2019; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018) altamente conservadas em eucariotos, cujos genes são conhecidos como grupo epistático de RAD52 (LIU et al., 2011).

Em eucariotos a sinalização para DSBs se dá pela ativação da cinase ATM que é recrutada para o local do dano através da interação com o complexo proteico MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) (BOSCH; BREE; LOWNDES, 2003), um dos primeiros complexos a serem recrutados (PAULL; LEE, 2005). Como citado anteriormente, o recrutamento de ATM por MRN desencadeia a fosforilação de uma enorme quantidade de substratos que darão início a cascata de sinalização ativando checkpoints do ciclo celular e promovendo o recrutamento de proteínas efetoras do reparo. Um desses substratos em mamíferos é a histona variante H2AX, a qual sofre fosforilação no resíduo de serina 139 localizada na extremidade carboxi terminal, passando a ser chamada então de Γ h2AX (BURMA et al., 2001; FOSTER; DOWNS, 2005). Uma vez que a histona é fosforilada (Γ h2AX), ela promove o recrutamento de mais moléculas de ATM para o local do dano que irão contribuir com o acúmulo de outras proteínas de reparo permitindo assim a existência de um feedback positivo como resposta (VÍTOR et al., 2020).

Sabe-se que duas das proteínas que compõem o complexo MRN, a Mre11 e Rad50 são conservadas em todos os reinos, enquanto a subunidade referente a Nbs1 está presente apenas em eucariotos (SYMINGTON, 2002). A subunidade Mre11, em humanos e leveduras, possui atividade endonuclease para fita simples de DNA (ssDNA) podendo ainda apresentar atividade de exonuclease (3'-5'). (PAULL; GELLERT, 1998; TRUJILLO et al., 1998). A Rad50 por sua vez está relacionada com a família de proteínas envolvidas na manutenção estrutural dos cromossomos (SMC, do inglês *Structural Maintenance of Chromosomes*) e apresenta atividade ATPase. A Rad50 também é capaz de estimular a atividade nuclease de Mre11 em leveduras e humanos (ALANI; SUBBIAH; KLECKNER, 1989; SYMINGTON, 2002). Já a proteína Nbs1, exclusiva de eucariotos, está envolvida com a regulação de proteínas de *checkpoint* do ciclo celular (D'AMOURS; JACKSON, 2002; FEATHERSTONE; JACKSON, 1998). Todas essas proteínas são de extrema importância a resposta primária as DSB e ativação das vias de reparo. O fato delas serem bem conservadas e encontradas em todos os eucariotos apenas evidencia a ancestralidade do mecanismo de reparo em resposta a DSB nessas células (SYMINGTON, 2014).

Uma vez que o complexo MRN se liga ao local do dano, juntamente com outras proteínas como CtIP que também apresenta atividade de nuclease (SARTORI et al., 2008), irão realizar o processamento das DSB por ressecção nucleofílica de aproximadamente 100 nucleotídeos, formando DNA de fita simples com extremidade 3' *overhang*, o qual será envolvido por proteínas de ligação a ssDNA como a proteína de replicação A, (RPA, do inglês *Replication, protein A*) (MEHTA; HABER, 2014). As ssDNA quando cobertas por RPA estão livres de ataques enzimáticos sendo essa uma forma de proteção do material genético, no entanto para que haja a busca e invasão da fita simples de DNA pela fita molde homóloga, é necessário a formação de nucleofilamentos proteicos de RAD51 (principal recombinase da via HR). Como a RPA possui maior afinidade de ligação a ssDNA do que a RAD51, outras proteínas mediadoras são então recrutadas para promover o deslocamento de RPA e substituição por RAD51 nas fitas simples. Em mamíferos os complexos de mediação incluem várias proteínas, dentre as quais se destaca a BRCA2, que interage diretamente com RAD51 (FILIPPO et al., 2007; ZHANG et al., 2009). Alguns autores sugerem que paralógos³ de RAD51 como as proteínas XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C e RAD51D também tenham papel crucial no reparo por HR, pois elas atuariam promovendo e/ou estabilizando os nucleofilamentos de RAD51 (SUWAKI; KLARE; TARSOUNAS, 2011).

O nucleofilamento de RAD51, após formado começa a buscar por homologia de sequência. Trabalhos com RecA, recombinase homóloga a RAD51 em bactérias, tem mostrado que essa busca pode acontecer de forma aleatória até os filamentos de RAD51 encontrarem sequências homólogas na fita molde (BIANCO; TRACY; KOWALCZYKOWSK, 2005). Após a sinapse do nucleofilamento com a dsDNA forma-se uma estrutura intermediária conhecida como D-loop, onde a partir da extremidade 3', uma polimerase específica consegue sintetizar a fita danificada usando o dsDNA como molde. Experimentos *in vitro* apontam para a provável atuação da polimerase *eta* (η) na extensão desse D-loop (MCLLWRAITH et al., 2005). O mesmo acontece para a segunda extremidade da DSB, onde o outro nucleofilamento de RAD51 promove a invasão e busca por homologia, seguidos de anelamento e extensão da fita. Essa invasão coordenada e guiada por RAD51 dá origem ao cruzamento entre fitas homólogas de DNA formando estruturas conhecidas como junções de Holliday duplas (Dhj, do inglês *double holliday junctions*) (HOLLIDAY, 1964; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; SUNG; KLEIN, 2006). Durante o reparo por HR em células mitóticas, o DNA homólogo utilizado como molde é de preferência a cromátide irmã não lesionada, evitando alterações genéticas e garantindo um mecanismo de reparo fiel, diferentemente dos

³ Genes que divergiram por duplicação; estão presentes em mais de uma cópia

eventos de recombinação homóloga observados na meiose, onde o objetivo é gerar variabilidade genética nos gametas (LIBERI; FOIANI, 2010).

As junções de Holliday como intermediários da HR estão presentes tanto na meiose como na mitose, no entanto os mecanismos que desfazem essas junções podem acontecer de maneiras diferentes. A resolução das dHJs, pode gerar produtos sem cruzamentos (noncrossover ou NCO) ao manter a sequência original do DNA ou pode gerar produtos com cruzamentos (crossover ou CO) oriundos de trocas de fragmentos gênicos entre as fitas homólogas. No geral, a dissipação das junções Holliday são mediadas por reações de clivagem e ligação podendo gerar produtos de CO e NCO, entretanto na via de reparo por HR, a utilização de helicases (BLM) e topoisomerases (3- α) específicas geram apenas produtos NCOs, em um processo denominado “dissolução das dHJs” (BIZARD; HICKSON, 2014; BZYMEK et al., 2010; MEHTA; HABER, 2014; MITCHEL et al., 2010) restabelecendo assim a sequência de DNA lesionada (Figura 1) .

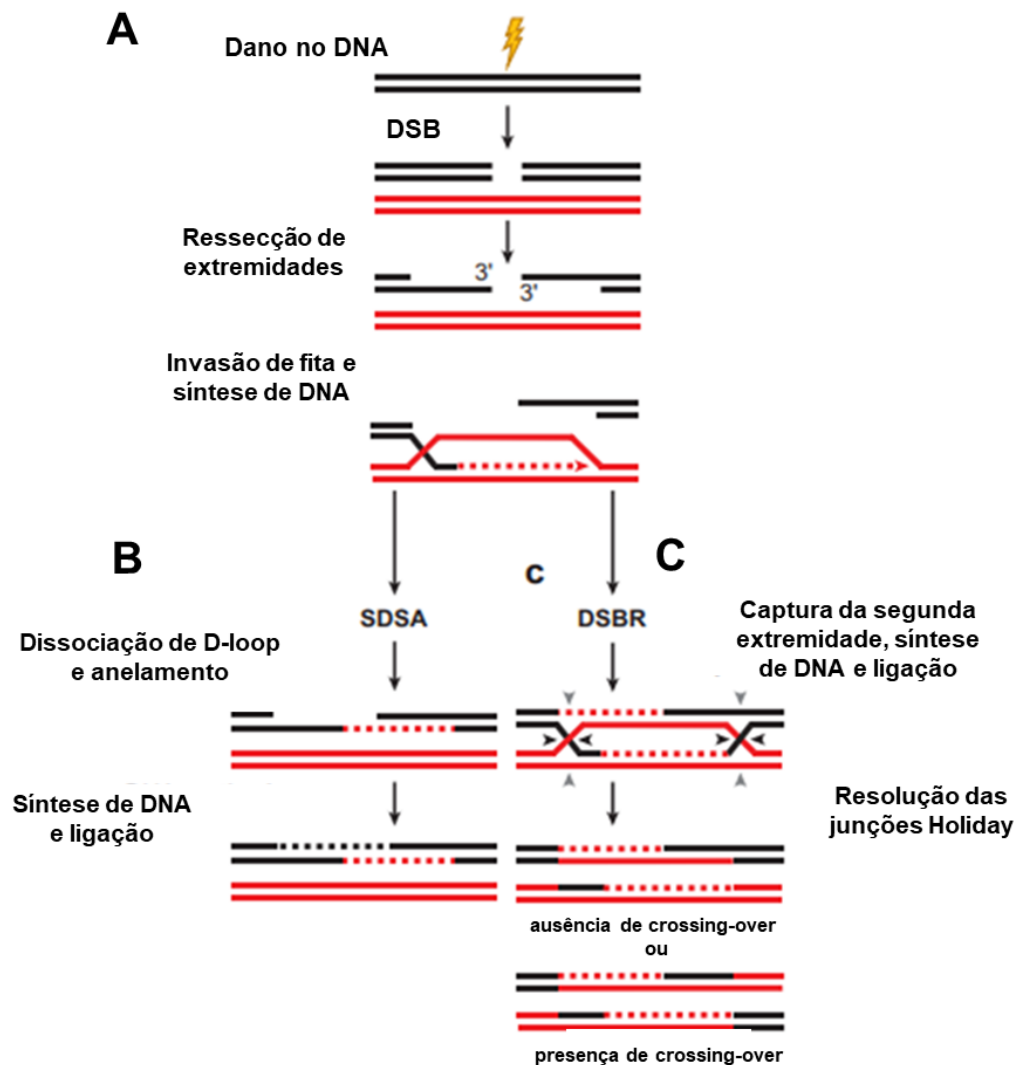


Figura 1 – Vias de reparo por recombinação homóloga. **A:** Quando há presença de quebras duplas no DNA, complexos proteicos como MRN e CtIP realizam o processamento das DSBs, formando extremidades de DNA de fita simples (3'), as quais serão recobertas por RPA e posteriormente por RAD51 para que a invasão na fita molde homóloga aconteça. **B:** SDSA – Hibridização de fitas dependente de síntese. Nessa via, após a formação do complexo sináptico durante a invasão de ssDNA e síntese de DNA, a fita invasora é liberada do D-loop (desfazendo-o) e se hibridiza com a fita simples complementar da outra extremidade da DSB. Nessa via não há formação de *crossing-over*. **C:** Reparo a DSB. As duas extremidades da DSB realizam o processo de invasão e formação do D-loop, originando a junção dupla de Holliday (dHJs), podendo gerar produtos *crossing-over* ou não *crossing-over*, a depender das enzimas a serem utilizadas. Figura retirada e traduzida de Filippo et al., 2008.

1.4.2. As recombinases RAD51 e DMC1

As DSBs podem ser geradas naturalmente durante o processo de meiose através da ação catalítica da proteína Spo11. A proteína é classificada como uma topoisomerase tipo II específica de meiose, a qual apresenta sequência de aminoácidos similar a topoisomerase encontrada nas Archeas (Top6A), sendo assim considerada uma proteína altamente conservada entre os organismos (BERGERAT et al., 1997; KEENEY; GIROUX; KLECKNER, 1997). Durante a meiose e para dar início ao mecanismo de recombinação, a Spo11 catalisa de 150 a 200 DSBs transientes no genoma, em regiões conhecidas como “*hot spot*”, proporcionando uma elevada frequência de recombinantes (KEENEY, 2001). Após gerar as quebras, a Spo11 é removida do DNA (NEALE; PAN; KEENEY, 2005) onde então ocorrerá a etapa de ressecção formando fita simples com extremidade 3’ *overhang* como descrito acima.

A Spo11 está presente no genoma de todos os eucariotos atuais e parece ser uma proteína universal de meiose. Seus homólogos podem ser encontrados até mesmo em organismos tidos como assexuais ou que não apresentam uma fase meiótica no seu ciclo de vida (RAMESH; MALIK; AND JOHN M. LOGSDON, 2005).

Os organismos de reprodução sexuada, através da meiose conseguem recombinar seus genes e garantir variabilidade genética a prole. A recombinação meiótica acontece através da conexão física entre os cromossomos homólogos durante a prófase I (PAGE; HAWLEY, 2003) permitindo a troca de informações genéticas entre os parentais. A principal diferença entre a recombinação em células somáticas e nos gametas é a recombinase utilizada na busca e invasão do DNA pela fita homóloga. No reparo por HR, é a RAD51 que desempenha esse papel, já na meiose quem assume essa função é a recombinase homóloga chamada DMC1 (do inglês *disrupted meiotic Cdna*) (BISHOP et al., 1992; BROWN; BISHOP, 2015).

Evidências do papel essencial de RAD51 também na meiose pode ser observada em leveduras, onde a recombinase estaria atuando como um fator acessório a DMC1, estimulando sua atividade de invasão e busca em até vinte vezes (TSUBOUCHI; ROEDER, 2006). Sendo assim, a RAD51 seria necessária tanto na mitose durante o reparo como também na meiose. De maneira diferente, a DMC1 é expressa somente em gametas atuando apenas na meiose (BISHOP et al., 1992). A localização específica de DMC1 somente em células reprodutivas pode ser observada em diferentes organismos, como no pólen da planta *Arabidopsis thaliana* (KLIMYUK; JONES, 1997), nos testículos de humanos (PONTÉN et al., 2009), em cistos do fungo patogênico *Pneumocystis* (MATSUMOTO; YOSHIDA, 1984) e no núcleo das células germinativas do ciliado *Tetrahymena* (HOWARD-TILL; LUKASZEWICZ; LOIDL, 2011).

Os genes que codificam para RAD51 e DMC1 divergiram após uma duplicação a partir do gene RadA encontrado nas archeas. O evento ocorreu no início da evolução dos eucariotos, originando genes semelhantes ao gene RecA de recombinação em bactérias (HOFSTATTER et al., 2020; HOFSTATTER; LAHR, 2019; RAMESH; MALIK; AND JOHN M. LOGSDON, 2005; STASSEN et al., 1997). A proteína RecA é essencial no reparo por HR em bactérias (COX, 1993), sendo capaz de se ligar a ssDNA e promover a recombinação genética nas células. Ao longo dos anos, diversos trabalhos identificaram proteínas homólogas a RecA nos mais variados organismos desde eucariotos a archaeas (STASSEN et al., 1997), revelando a presença de mecanismos recombinacionais provavelmente desde o início da vida.

Os organismos que realizam meiose e que possuem genes tanto de RAD51 como DMC1 em seus genomas apresentam o envolvimento de ambas as proteínas em processo de recombinação meiótica, a fim de promover o pareamento e a sinapse entre os cromossomos homólogos. No entanto, existem organismos que mesmo na ausência de DMC1 ainda assim são capazes de realizar recombinação com pareamento e sinapse de homólogos, como acontece por exemplo com *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, (VILLENEUVE; HILLERS, 2001). Segundo Ramesh e colaboradores (2005), os organismos que não possuem DMC1 são eucariotos evolutivamente mais recentes, sugerindo uma perda desse gene ao longo da evolução.

Curiosamente, há indícios de que a RAD51 de *C. elegans* possui funções similares a DMC1. Análises recentes comparando sequências proteicas de RAD51 e DMC1 de diferentes organismos têm sugerido que resíduos de aminoácidos específicos são os responsáveis por conferir características bioquímicas ligeiramente diferente, mas extremamente cruciais para que a meiose aconteça. A recombinase DMC1 possui resíduos que favorecem o estabelecimento e permanência do heteroduplex de DNA na presença de bases mal pareadas, o que possibilitaria a recombinação de modo a favorecer a variabilidade genética (STEINFELD et al., 2019).

As duas recombinases também possuem diferentes mediadores que promovem a montagem de filamentos, sendo Rad52, mediador dos filamentos de RAD51 e Mei5/Sae3 promovendo a montagem dos filamentos de DMC1. Essas características dão margem a possibilidade de que os mediadores direcionem de forma individual as recombinases para locais específicos (CRICKARD et al., 2018), sendo por isso DMC1 encontrada apenas nos gametas.

As proteínas DMC1 e RAD51 pertencem a superfamília das RecA (recombinases dependentes de ATP) e estão envolvidas em processos de recombinação especificamente em eucariotos (HOFSTATTER; LAHR, 2019; SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008). As

estruturas tridimensionais das proteínas dessa família tem sido bem caracterizadas nas últimas décadas, como pode-se observar para RadA (YANG et al., 2001), RecA (CHEN; YANG; PAVLETICH, 2008; STORY; WEBER; STEITZ, 1992), Rad51 (XU et al., 2017) e DMC1 (PASSY et al., 1999; SEHORN et al., 2004). Informações extraídas com base nas caracterizações estruturais dessas recombinases, mostram que existe uma alta conservação tridimensional entre os seus monômeros, o que já não pode ser observado quanto aos seus estados oligoméricos. Todas as recombinases dessa família quando na presença de ATP e ssDNA formam um polímero em volta do DNA chamado filamento helicoidal ou nucleofilamento. Para RecA, RadA e Rad51 de alguns organismos, esses nucleofilamentos são compostos por seis monômeros a cada volta, com diferenças entre os *pitches* (distância entre as voltas de uma hélice) de cada recombinase. Para DMC1, assim como para RadA foi observado a existência de dois estados oligoméricos: filamentos helicoidais e anéis octâmeros. Na ausência de ATP, os monômeros de DMC1 formam octâmeros duplos interconectados em volta da ssDNA, enquanto na presença de ATP, os octâmeros são desfeitos e os nucleofilamentos formados, mudando assim a conformação estrutural da proteína (SUNG; KLEIN, 2006). Hipotetiza-se que essa mudança conformacional seja devido a interação entre o domínio N-terminal de um monômero e o domínio ATPase do outro monômero quando na presença de ATP. Apesar das estruturas monoméricas serem bem conservadas entre os organismos, os diferentes estados oligoméricos (filamentos helicoidais e anéis) observados nessa família RecA de proteínas, demonstra uma alta flexibilidade conformacional o que pode tornar dinâmica a funcionalidade dessas proteínas nas diferentes espécies (KINEBUCHI et al., 2005).

Alguns trabalhos recentes na área de biologia estrutural com as recombinases de eucariotos, DMC1 e RAD51, conseguiram identificar resíduos de aminoácidos específicos de cada uma, que podem explicar e elucidar o papel característico dessas proteínas durante a recombinação homóloga, seja no reparo ou na meiose (LEE et al., 2015; LUO et al., 2021; STEINFELD et al., 2019). Como citado anteriormente, durante a recombinação homóloga os filamentos pré-sinápticos (recombinases RAD51/DMC1 + ssDNA) participam do processo de invasão no DNA molde e busca por homologia de sequência, onde então a partir dos filamentos pós-sinápticos (recombinase + dsDNA heteroduplex) acontece a recombinação de sequências por meio das trocas genéticas. Trabalhos de biologia estrutural com as proteínas da família RecA têm mostrado que os nucleofilamentos pré-sinápticos dessas recombinases interagem com a molécula de DNA em forma de tripletos de nucleotídeos (CHEN; YANG; PAVLETICH, 2008). Com base em energia de ligação, estudos bioquímicos mostraram que os filamentos pré-sinápticos são montados e estabilizados de três em três passos, coincidentes com as bases dos tripletos (LEE et al., 2015). No entanto, foi observado que

nucleofilamentos formados por Rad51 e RecA não conseguem estabilizar tripletos do heteroduplex de DNA (ssDNA + DNA molde) quando estes apresentam bases mal pareadas. Diferente do observado para os nucleofilamentos da recombinase meiótica DMC1, que consegue estabilizar mau pareamento de base simples, duplo e triplo dos nucleotídeos (Figura 2) (LEE et al., 2015; LUO et al., 2021).

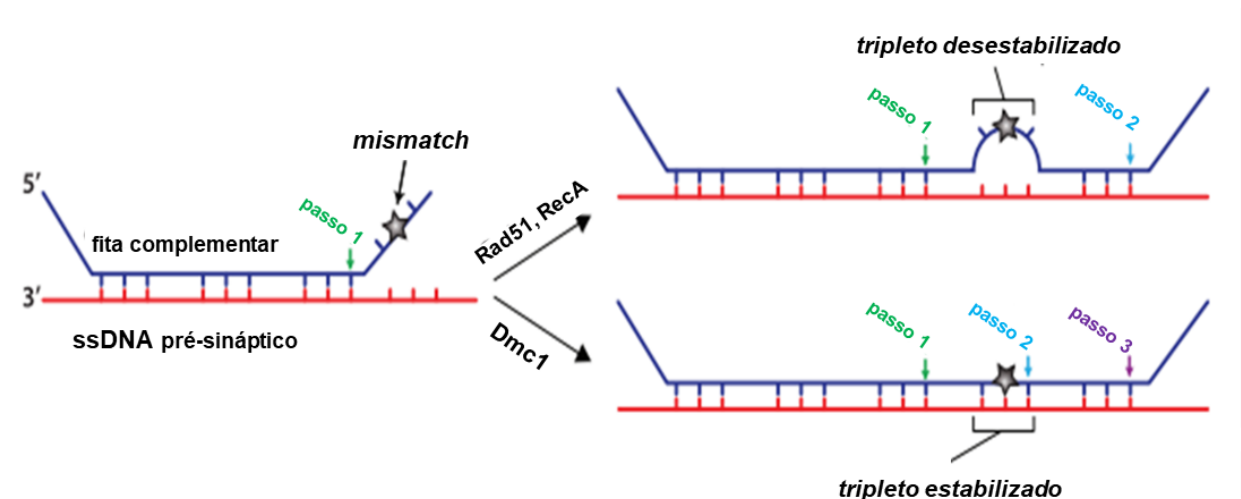


Figura 2 – Esquema ilustrativo das interações dos filamentos pré-sinápticos de RAD51 e DMC1 com a molécula de DNA na presença de bases mal pareadas. Durante a formação dos nucleofilamentos, sua montagem ocorre com base em reconhecimento de tripletos, onde cada monômero da recombinase interage com três nucleotídeos por vez. Quando há presença de bases mal pareadas entre o filamento pré-sináptico e a fita molde de DNA complementar, as recombinases Rad51 e RecA não conseguem estabilizar o tripleto, diferente da recombinase meiótica DMC1 a qual, é capaz de estabilizar bases mal pareadas. Figura retirada e traduzida de Lee et al., 2015.

1.4.3. Genes e proteínas específicas de meiose

Genes específicos de meiose são bem conservados na maioria dos eucariotos. Trinta e quatro genes codificantes para maquinaria de recombinação, coesão entre cromátides irmãs, e complexos sinaptonêmicos foram identificados por análises filogenéticas em diversos eucariotos, sendo que doze desses genes funcionam exclusivamente em meiose : *SPO11-1*, *SPO11-2*, *HOP1*, *HOP2*, *MND1*, *DMC1*, *MSH4*, *MSH5*, *MER3*, *ZIP1*, *ZIP4* e *REC8* (MALIK et al., 2007, 2008). Os organismos mutantes para genes como *SPO11*, *MND1*, *HOP2*, *DMC1*, *REC8*, *MSH4*, e *MSH5*, geralmente apresentam problemas na iniciação e progressão da recombinação homóloga ou na coesão das cromátides irmãs (SCHURKO; LOGSDON; EADS, 2009). Em eucariotos, DMC1 é necessária para a ocorrência de níveis normais de recombinação meiótica, adequada formação do complexo sinaptonêmico e progressão para

além da prófase meiótica. Sendo que a ausência de *DMC1* em camundongos causa infertilidade reprodutiva nos animais (PITTMAN et al., 1998). Já o complexo protéico Hop2-Mnd1, altamente conservado em eucariotos, tem sido caracterizado como sendo um fator auxiliar da recombinase DMC1 durante a recombinação homóloga meiótica. O heterodímero formado pelas proteínas Hop2 e Mnd1 guia e ajuda a manter a estabilidade dos nucleofilamentos de DMC1 em busca do DNA homólogo nos D-loops da HR (BROOKS CRICKARD et al., 2019; HENRY et al., 2006; PEZZA et al., 2006; TSUBOUCHI et al., 2020).

Recentemente, uma possível ancestralidade sexuada dos eucariotos foi relatada com base em análises filogenéticas de proteínas específicas de meiose (HOFSTATTER; LAHR, 2019). Como já sugerido anteriormente por Grelon (2016), Hofstatter e Lahr (2019) também defendem a hipótese de que a maquinaria meiótica teria evoluído a partir da maquinaria de reparo do DNA de um ancestral comum, nesse caso as archeas, através de duplicação de genes ancestrais como ilustrado na figura 3^a. Não à toa, segundo os autores, as proteínas relacionadas com processos sexuais encontram-se amplamente distribuídas nos eucariotos, não sendo possível observar diferença no padrão de distribuição de proteínas meióticas entre eucariotos sexuais e os tidos como assexuais. Sobre origem e evolução da reprodução sexuada, os autores discutem o fato de alguns indivíduos do reino protista por exemplo, apresentarem grande parte dos genes de meiose, mas não todos. Ao observar o padrão evolutivo, a hipótese mais parcimoniosa seria atribuída a eventos de perdas gênicas ao longo da evolução, como já relatado por Ramesh e colaboradores (2005). Sendo assim, o ancestral comum de todos os eucariotos já possuiria a maquinaria necessária para a realização da meiose, tendo, portanto, uma reprodução sexuada (figura 3B). Se a recombinação meiótica tivesse surgido mais de uma vez na escala evolutiva, provavelmente a reprodução sexuada exibiria diferentes mecanismos de atuação, o que não se aplica a meiose, já que o mecanismo é bem conservado e compartilhado entre todas as linhagens de eucariotos (HOFSTATTER et al., 2020; HOFSTATTER; LAHR, 2019).

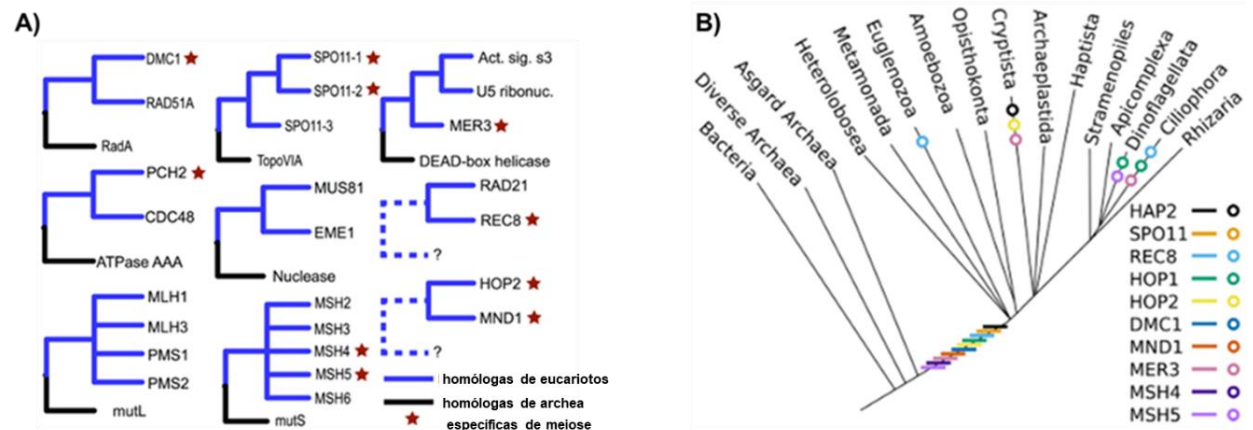


Figura 3 – Simplificação filogenética de proteínas meióticas e sua distribuição nas principais linhagens de eucariotos. A: Surgimento de proteínas específicas de meiose oriundas de duplicação gênica a partir de um ancestral do grupo das Archeas. Figura retirada de Hofstatter e Lahr, 2019. **B:** Visualização de perdas gênicas secundárias da maquinaria meiótica (círculos vazios) ao longo da evolução dos eucariotos. Figura retirada de Hofstatter et al., 2020.

1.5. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico da doença de Chagas, é um protista que majoritariamente se reproduz de forma assexuada mesmo tendo genes de meiose em seu genoma (CRUZ-SAAVEDRA et al., 2020; WEEDALL; HALL, 2014). Descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, a doença é considerada uma enfermidade tropical negligenciada da América Latina. No entanto, tem se espalhado de forma crescente para a América do Norte, Europa e Ásia, tornando-se uma preocupação global (MANNE-GOEHLER et al., 2016; WHO, 2020). A doença possui uma ampla distribuição, com estimativas de que existam de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas com esse protozoário em todo o mundo e mais de 75 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção (WHO, 2020). Em humanos, a fase aguda da doença pode durar entre quatro e oito semanas, e geralmente é manifestada logo após a infecção apresentando sintomas brandos e não específicos. Já na fase crônica, 70% a 80% dos casos podem permanecer pela vida toda em uma forma assintomática. No entanto, uma taxa de 20% a 30% dos indivíduos infectados, após um período de 10 a 20 anos, podem desenvolver casos clínicos da doença, com manifestações cardíacas, digestivas ou ambas e até mesmo neurológicas (BERN et al., 2007; VIOTTI et al., 1994; WHO, 2020).

O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório que tem como hospedeiro invertebrado insetos hematófagos da família Triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros” e

como hospedeiros vertebrados, diferentes mamíferos, incluindo os seres humanos (BRENER, 1973). O parasito pode ser transmitido à humanos através das fezes de insetos triatomíneos, por transfusão sanguínea, por acidentes laboratoriais, de forma oral através de alimentos processados contaminados com os parasitos, por transplantes de órgãos e de forma congênita através da placenta (CASADEI, 2010; WHO, 2020). Conforme seu ciclo de vida (CHATELAIN, 2014, 2017) descrito na figura 4, o parasito possui uma forma replicativa: epimastigota no inseto vetor e amastigota nos vertebrados e uma forma infectiva: tripomastigota metacíclica no inseto e tripomastigota sanguínea nos vertebrados, (DE SOUZA, 2009; DOCAMPO et al., 2005) apresentando uma grande plasticidade fenotípica.

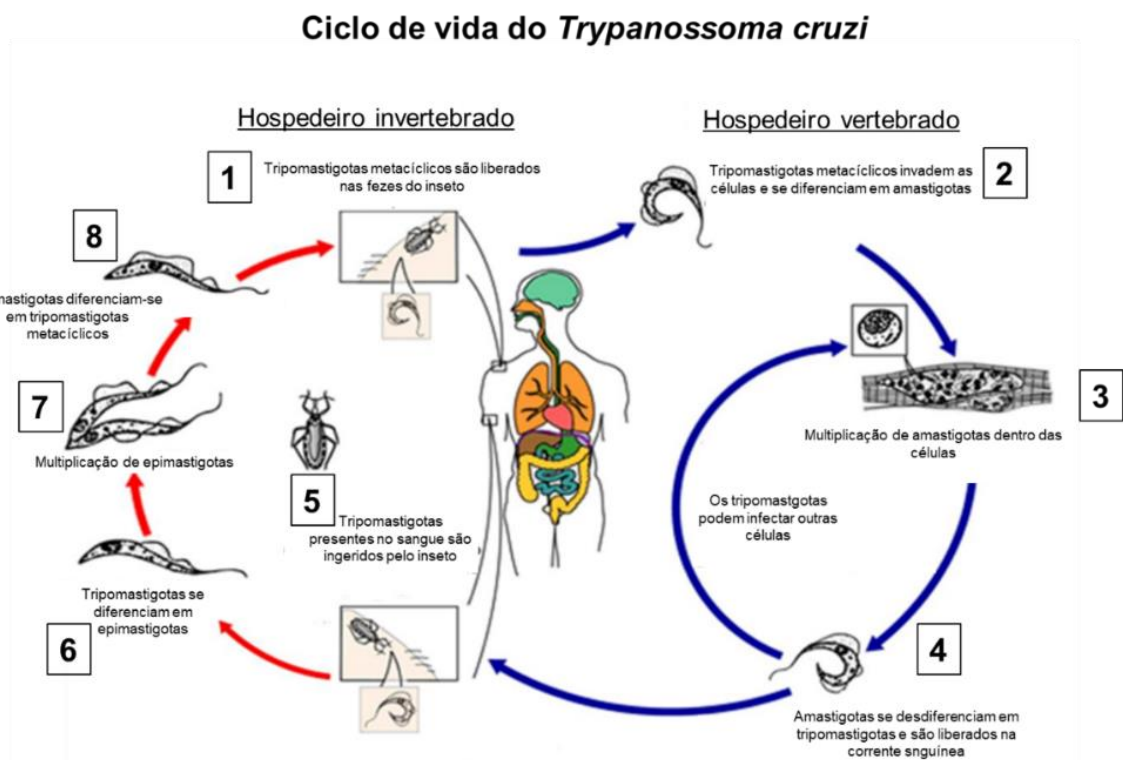


Figura 4 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Esquema ilustrativo do ciclo de vida do parasito, apresentando as suas diferentes formas no hospedeiro invertebrado (tripomastigota metacíclico e epimastigota) e no hospedeiro vertebrado (amastigota e tripomastigota sanguíneo). Figura adaptada do CDC – Center for Disease Control.

Devido a unicelularidade e a diferenciação sexual não tão aparente em grande parte dos protistas, a reprodução vegetativa (assexuada) foi tida como a única forma de reprodução desses organismos por muito tempo. No entanto, atualmente já é conhecido que alguns protozoários como Plasmodium, Toxoplasma, Leishmania e Trypanosoma dentre outros, apresentam uma fase de vida com reprodução sexuada (WEEDALL; HALL, 2014).

Em parasitas do grupo dos cinetoplastídeos como *Trypanosoma* e *Leishmania*, eventos de trocas genéticas foram identificados a partir de cruzamentos dos parasitas nos seus respectivos hospedeiros invertebrados: em moscas tse-tse infectadas por *Trypanosoma brucei* (MACLEOD et al., 2005) e em moscas da areia infectadas por *Leishmania major* (AKOPYANTS et al., 2009). Em *T. brucei*, a formação de híbridos através do processo de fusão celular foi demonstrado tanto em experimentos *in vivo*, em que células híbridas foram localizadas nas glândulas salivares da mosca tse-tsé (GIBSON et al., 2008) como também em experimentos *in vitro* (PEACOCK et al., 2014). Análises de conteúdo do DNA, ao longo do ciclo de vida do parasito, mostrou uma haploidia quando os mesmos estão presentes nas glândulas salivares da mosca tsé-tsé e um aumento na expressão de genes de meiose momentos antes do processo de fusão celular (PEACOCK et al., 2011, 2014). Essas evidências apontam para uma fase sexuada e presença de meiose nesse parasito. Já em *T. cruzi* eventos de hibridização entre as linhagens foram relatados apesar da falta de evidências de que o processo de meiose estaria de fato acontecendo (BRISSE et al., 2003; WESTENBERGER et al., 2005). Entretanto, trabalhos recentes com genética de população têm relatado uma possível reprodução sexuada em populações naturais desse parasito (BERRY et al., 2019; SCHWABL et al., 2019). A partir de experimentos *in vitro*, Gaunt e colaboradores (2003), apresentaram as primeiras evidências de que trocas genéticas estariam ocorrendo também em *T. cruzi*. Duas cepas carregando marcadores de seleção diferentes (higromicina ou neomicina), ao serem misturadas produziram cepas híbridas em células de mamíferos, onde carregavam os dois marcadores de seleção. Todavia, a possível explicação para essa troca genética em *T. cruzi* não estava relacionada a meiose e sim a fusão de células diploides seguida de perda cromossômica (GAUNT et al., 2003; WEEDALL; HALL, 2014). Entretanto, conforme sugerem alguns autores, a observação direta tanto *in vivo* quanto *in vitro*, podem de fato confirmar a reprodução sexuada, mas a não observação, não se torna uma evidência definitiva de que a espécie se reproduza apenas de forma assexuada (COOPER et al., 2007), deixando assim em aberto esse questionamento em *T. cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi* apresenta uma ampla diversidade genética intraespecífica classificado em seis unidades de tipagem discreta (DTUs), TcI – TcVI, com distribuições definidas pela geografia, ecologia e ciclos de transmissão (ZINGALES et al., 2009, 2012). Uma sétima DTU, a Tcbat (cepa parasita de morcegos), tem sido proposta baseada em características genéticas observadas entre as diferentes cepas existentes. Alguns estudos tentam associar as diferentes DTUs de *T. cruzi* com a patologia clínica da doença de Chagas, já que diferentes cepas possuem diferentes graus de virulência e infectividade (COURA, 2007; ZINGALES et al., 2012). A presença de múltiplas cepas na mesma área geográfica e a possibilidade de infecção mista entre cepas de diferentes tropismos ou virulência, podem

contribuir ainda mais para o aumento da variabilidade genética observada nesse parasito (CHATELAIN, 2014) o que também pode dificultar a busca por um tratamento direcionado e eficaz contra a doença de Chagas, ainda inexistente.

A reprodução de *T. cruzi* ocorre principalmente de forma assexuada e as variações genéticas observadas nesse parasito devem-se ao acúmulo de mutações pontuais transmitidas ao longo das gerações para às células-filhas clones (TIBAYRENC et al., 1986). No entanto, é possível observar a presença de cepas híbridas na natureza, como é o caso das cepas dos grupos TcV e TcVI derivadas provavelmente de hibridização de cepas TcII e TcIII (STURM et al., 2003; STURM; CAMPBELL, 2010), sugerindo a ocorrência de eventos naturais de trocas gênicas nesse parasito ao longo da evolução.

O *T. cruzi* foi considerado por muitos anos como um enigma para os estudiosos da estrutura de população clonal em microrganismos patogênicos, já que no modelo de evolução clonal, a recombinação genética encontra-se comprometida (TIBAYRENC; AYALA, 2012, 2013). Para alguns autores, o parasita se reproduz de forma clonal com a ocorrência de raros eventos de trocas genética (BRISSE et al., 2003), já para outros, essas trocas não seriam tão raras assim, tendo uma frequência mais elevada do que retrata a literatura (BATIPSTA et al., 2014).

A ocorrência de híbridos naturais e a capacidade de trocas genéticas desse parasito *in vitro* tem levado a quebra de paradigmas no que diz respeito a sua reprodução (OCANA-MAYORGA et al., 2010; TIBAYRENC; AYALA, 2018), já que vem sendo sustentada por evidências de uma possível reprodução sexuada (BERRY et al., 2019; RUSMAN et al., 2020; SCHWABL et al., 2019).

1.5.1. Recombinação homóloga em *T. cruzi*

Assim como na maioria dos eucariotos, a via de Recombinação Homóloga em resposta a DBSs, apresenta-se como a mais conservada e predominante nesses tripanossomatídeos (BHATTACHARYYA; NORRIS; KUMAR, 2004; GLOVER; JUN; HORN, 2011; GLOVER; MCCULLOCH; HORN, 2008). Além do papel no reparo a quebras duplas, a HR pode também estar envolvida em processos de recombinação meiótica nesse parasito contribuindo assim com a variabilidade observada.

Como já visto anteriormente, a cinase ATM tem papel fundamental nas vias de reparo a DSBs em eucariotos. Devido a sua atividade na sinalização da DDR, atuando no início da via de reparo por recombinação homóloga e diante da escassez de informações sobre essa

cinase em *Trypanosoma cruzi* na literatura, o grupo do Dr Carlos Renato Machado (ICB/UFMG) construiu parasitos modificados para a cinase ATM (tese Costa-Silva, 2019). O gene está localizado no cromossomo 1, possui 12705 pares de base e codifica para uma proteína de 4234 aminoácidos. No referido trabalho, células de *T. cruzi* tiveram um de seus alelos interrompidos na região do domínio cinase da proteína, conforme esquema ilustrado abaixo, originando células ATM dominantes negativo viáveis.

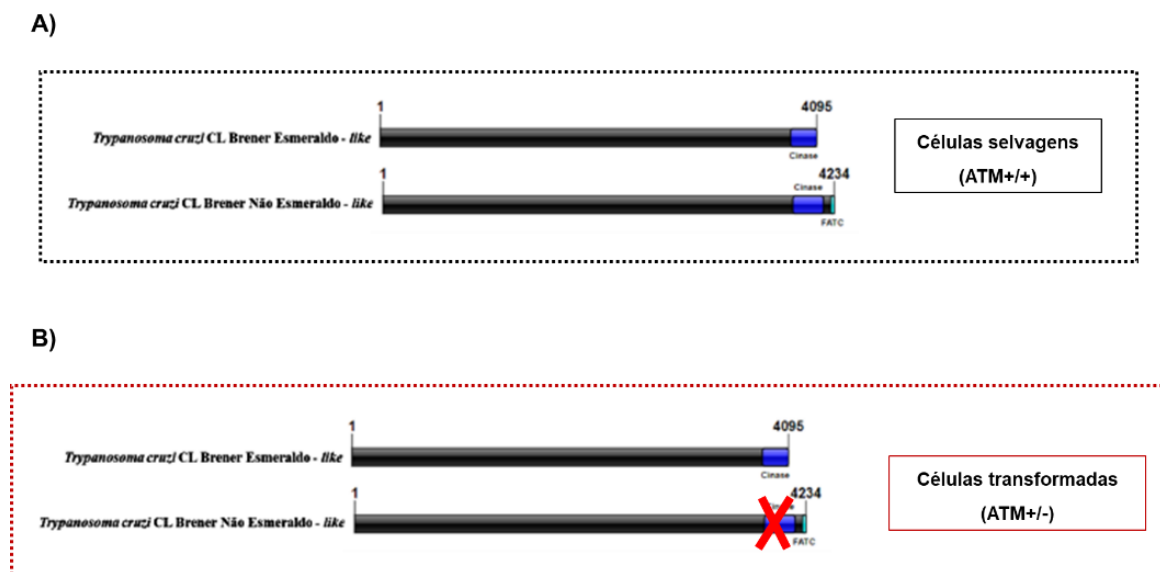


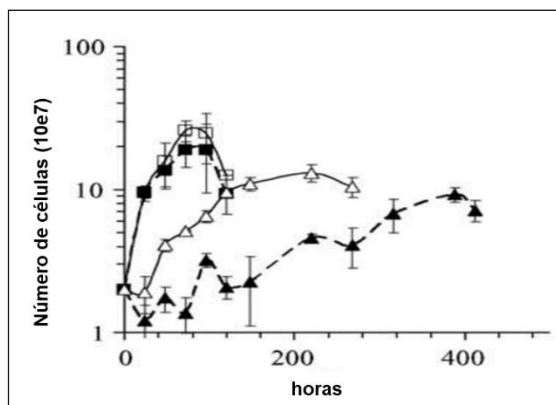
Figura 5 – Esquema da depleção de ATM em *T. cruzi*. **A:** Domínios da cinase ATM encontrados nos dois alelos do parasito selvagem (CL-Brener Esmeraldo-Like e CL-Brener Não Esmeraldo -like), através do software *Conserved Domains Database*. **B:** Representação da região cinase de ATM interrompida em um dos alelos de *T. cruzi* (CL-Brener Não Esmeraldo -like), representada pelo X em vermelho. Figura adaptada de tese (Costa-Silva, 2019).

Quanto as recombinases da HR, segundo relata a literatura, DMC1 e RAD51 de *Trypanosoma cruzi*, apresentam 48% de identidade de sequência de aminoácidos entre elas. Quando comparadas com as sequências das recombinases de humanos, as quais já são bem caracterizadas estrutural e bioquimicamente, a RAD51 do parasito apresenta 66% de identidade, enquanto a DMC1 apresenta 62% (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2006).

O gene RAD51 (TcRAD51) é expresso em todas as fases do ciclo de vida do parasito, tendo a sua expressão mais acentuada na fase intracelular, nas formas de amastigota (REGIS-DA-SILVA et al., 2006) enquanto para o gene DMC1 não há relatos na literatura. Já foi demonstrado que em *T. cruzi*, a Rad51 está envolvida com processos de recombinação e reparo do DNA (GOMES PASSOS SILVA et al., 2018). Linhagens do parasito superexpressando essa recombinase mostraram-se mais resistentes a radiação ionizante,

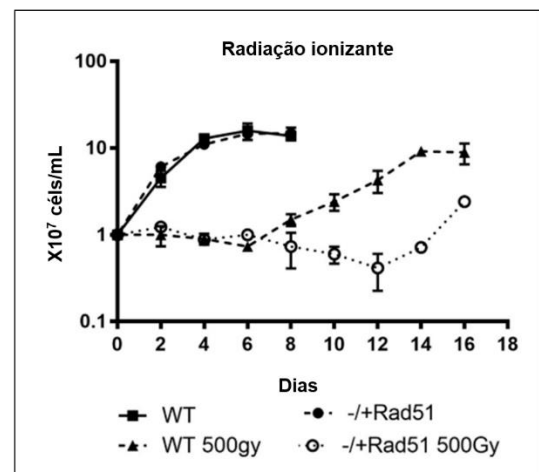
enquanto linhagens heminocautes para o gene mostraram-se menos resistente, tendo um crescimento prejudicado quando comparadas a células selvagens, como observado na figura 6 (GOMES PASSOS SILVA et al., 2018; REGIS-DA-SILVA et al., 2006). De maneira semelhante a IR, os parasitas que superexpressaram o gene RAD51 mostraram-se mais resistentes aos danos provocados pelo peróxido de hidrogênio ao passo que células heminocautes foram mais sensíveis ao peróxido (GOMES PASSOS SILVA et al., 2018), sugerindo que a recombinase também tem papel fundamental no reparo a lesões oxidativas nesse tripanossomatídeo. Gomes Passos Silva e colaboradores (2018) também mostraram que animais infectados com *T. cruzi* superexpressores de RAD51 apresentaram maiores taxas de parasitemia e maior resistência ao tratamento com benzonidazol (droga usada na fase aguda da doença) quando comparados a animais infectados com células heminocautes. O que corrobora o papel de proteínas da HR em resposta a estresse oxidativo ao qual o parasito está sujeito durante todo o seu ciclo de vida (RAJÃO et al., 2010).

A) Superexpressor de RAD51



Regis-da-Silva et al., 2006

B) Heminocaute de RAD51



Gomes Passos Silva et al., 2018

Figura 6 – Curvas de crescimento de *T. cruzi* superexpressores e heminocautes para RAD51, submetidos a radiação gama. Células de *Trypanosoma cruzi* submetidas a 500 Gy de radiação gama comparadas com células não irradiadas. **A:** SuperRAD51 irradiado representado por triângulos abertos e os não irradiados por quadrados abertos. Células WT CL Brener irradiadas representadas por triângulos fechados e as não irradiadas por quadrados fechados (Figura retirada de Regis-da-Silva et al., 2006). **B:** células heminocautes para RAD51 irradiadas representadas por círculos abertos (-/+Rad51 500Gy) e as não irradiadas por círculos fechados (-/+Rad51). Células selvagens CL Brener irradiadas representadas por triângulos fechados (WT 500Gy) e as não irradiadas por quadrados fechados (WT) (Figura retirada de Gomes Passos Silva et al., 2018). É possível observar que as células superRAD51 irradiadas apresentam um melhor crescimento quando comparadas as células WT

irradiadas, diferente das células Rad51+/-, confirmando o papel de RAD51 na resposta do parasito as DSBs provocadas pela radiação.

No que diz respeito a células selvagens naturalmente híbridas, como é o caso da cepa CL Brener (TcVI), já foi visto que os níveis dos transcritos de RAD51 e BRCA2 são maiores nesses parasitos (ALVES et al., 2018). No mesmo trabalho, os autores também observaram que as células híbridas mostraram uma melhor resposta a radiação ionizante, retomando o crescimento muito mais rápido quando comparadas a células não híbridas. Através de experimentos de incorporação dos análogos de timidina (AdexTA, do inglês *Analysis of DNA Exchange by Thymidine Analogs*) (DA SILVA M et al., 2018) utilizado para detectar trocas de material genético, foi possível observar um aumento no processo de fusão de células e nos eventos de trocas genéticas em linhagens híbridas naturais de *T. cruzi* (ALVES et al., 2018) observando o mesmo ao utilizarem células superexpressoras de RAD51. Apesar dos resultados obtidos pelo grupo não apontarem tetraploidia após fusão dessas células, ainda assim apresentaram um maior conteúdo de DNA do que as células selvagens (ALVES et al., 2018), mostrando que a recombinase da HR, Rad51, pode ter um papel importante nos processos que levam a fusão e a variabilidade em *T. cruzi*. Novas hipóteses envolvendo níveis de RAD51 e o papel da HR em processos de dormência, infecção, replicação e morfologia do parasito também têm sido levantadas (RESENDE et al., 2020).

Apesar dos trabalhos acima citarem o papel da recombinação homóloga através de RAD51 em *T. cruzi* (TcRad51), a literatura ainda é incipiente no que diz respeito a recombinase DMC1. Estudos sobre a caracterização de DMC1 e o seu papel vem sendo conduzidos ao longo dos anos em diferentes protozoários como em *Entamoeba histolytica* (KELSO et al., 2015), *Plasmodium berghei* (MLAMBO; COPPENS; KUMAR, 2012), *Cryptosporidium parvum* (JUMANI et al., 2019) e *Trypanosoma brucei* (PEACOCK et al., 2011, 2014), entretanto para *Trypanosoma cruzi* ainda não há relatos do papel de DMC1 na literatura.

Como parasita filogeneticamente mais próximo de *T. cruzi*, são notórias as comparações com o *T. brucei*, para o qual já foi visto que DMC1 não desempenha papel no reparo de DNA, na eficiência de recombinação e nem na frequência de mutações VSG (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2006), tendo sim papel crucial na formação de células híbridas e na meiose. Sabe-se que o genoma desses parasitos contém sequência gênica para uma cópia simples e bem conservada da proteína DMC1. Com base em análises comparativas a partir de sequências de aminoácido, as recombinases de *T. brucei* e *T. cruzi* apresentam 90% de identidade entre elas (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2006), sugerindo que talvez DMC1

possa estar exercendo o mesmo papel meiótico em *T. cruzi*. Diante disso, a hipótese deste trabalho é que a via de recombinação homóloga e suas recombinases RAD51 e DMC1, além de desempenharem um importante papel nos eventos de reparo de DNA, também possam estar envolvidas no sexo meiótico em *T. cruzi*, contribuindo assim com a variabilidade genética do parasito.

Entender de que forma esses protozoários se reproduzem e sobrevivem ainda continua sendo de grande interesse científico, médico e econômico já que a doença de Chagas descrita há mais de 100 anos, ainda continua sendo um caso de saúde pública preocupante. A elucidação dos mecanismos de troca genética e fusão nesse protozoário não só traz luz a história evolutiva desses organismos, mas também pode ajudar a entender como os genes relacionadas à virulência e resistência a medicamentos podem estar sendo transferidos dentro das populações. Sendo que o processo de recombinação meiótica em *T. cruzi* pode estar direta ou indiretamente envolvido nessas questões.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar genes envolvidos na recombinação em *Trypanosoma cruzi* caracterizando o seu envolvimento nos processos de reparo de DNA e formação de híbridos.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a resposta dos parasitos modificados para DMC1 quando submetidos a radiação ionizante.
- Investigar a cinética de reparo após tratamento com radiação ionizante em parasitas geneticamente modificados para os genes DMC1, RAD51 e ATM (envolvidos na recombinação).
- Analisar a expressão gênica transcricional de DMC1, RAD51 e ATM nos parasitos modificados irradiados e não irradiados.
- Averiguar a taxa de hibridização citoplasmática entre células de *T. cruzi* mutantes para as recombinases RAD51 e DMC1.
- Avaliar a relação estrutura-função das recombinases RAD51 e DMC1 de *Trypanosoma cruzi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos envolvendo manipulação genética de *T. cruzi* foram realizados no laboratório com Nível de Biossegurança NB2 aprovado pela CTNBIO (CQB nº 0038/97).

3.1. Linhagens do parasito e Cultivo de células

Neste estudo foram utilizadas formas epimastigotas selvagens e modificadas das cepas CL Brener e Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. As células foram cultivadas à 28°C em meio *Liver Infusion Tryptose* – LIT (0,5% de liver digested neutralized, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% de KCL, 0,8% de Na₂HPO₄, 20 µg.Ml⁻¹, Ph 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen).

A cepa de *Trypanosoma cruzi* CL Brener, utilizada nesse trabalho foi gentilmente cedida pelo Dr. Egler Chiari (Universidade Federal de Minas Gerais), enquanto a cepa de *Trypanosoma cruzi* Dm28c foi gentilmente cedida pelo Doutor Stenio Fragoso (ICC – Fiocruz Paraná).

Os parasitos heminocutes (CL Brener) para o gene RAD51 (Gomes Passos Silva et al., 2018) e ATM (tese Costa-Silva, 2019) foram construídos anteriormente por nosso grupo de pesquisa. As células superexpressoras dos genes DMC1 e RAD51 (Dm28c) foram construídas durante o desenvolvimento deste trabalho.

3.2. Construção dos parasitos modificados

Para a construção dos parasitos superexpressores do gene de meiose, DMC1, foi utilizado o vetor de expressão Prock (DAROCHA et al., 2004), o qual através da recombinação homóloga se integra no locus da β -tubulina do parasito. A sequência gênica de TcDMC1 (banco de dados Trytrypdb⁴, sob número de acesso TcCLB.506885.310) e 3,6µg do vetor modificado com o gene de resistência a Neomicina (pROCKGFPNeo), foram enviados à

⁴ Link de acesso: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>

empresa FastBio® (GeneSscript®) para síntese comercial do cassete de superexpressão Prock_DMC1Neo. Conforme figura abaixo:

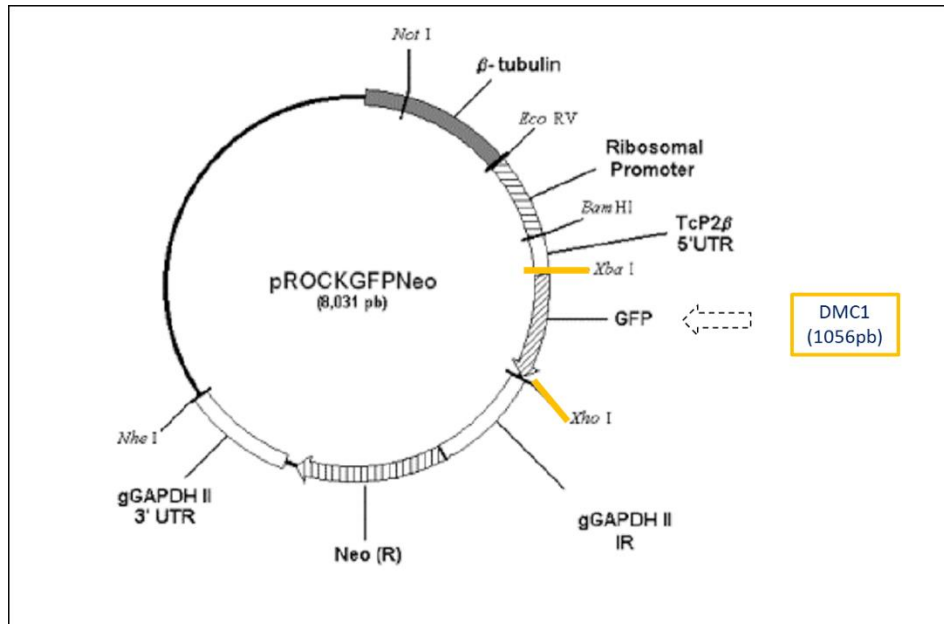


Figura 7 – Esquema de clonagem no vetor de expressão pROCKGFPNeo enviado para síntese comercial. A sequência gênica de DMC1 de *T. cruzi* foi inserida no lugar da sequência de GFP, entre os sítios de restrição para XbaI e XhoI, sob regulação de um promotor ribossomal presente no próprio vetor.

Para a construção das células de *T. cruzi* superexpressoras de RAD51 foi utilizado o mesmo vetor de expressão Prock (DAROCHA et al., 2004), com o gene de resistência a Higromicina.

3.3. Iniciadores utilizados para selecionar os parasitos

Os iniciadores listados abaixo foram desenhados em trabalhos anteriores pelo grupo. Todos foram sintetizados pela empresa IDT Technologies e diluídos em água deionizada estéril para a concentração estoque de 200 Mm. Aqui neste trabalho foram utilizados em reações de PCR convencional afim de identificar os clones transformados.

Tabela 1 – Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR convencional.

Enzimas de restrição	Sequência
HygroFw	5' TCT AGA ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC 3'
HygroRev	5' GTC GAC TTA GGA TCG GGG GAT CGA 3'
NeoFw	5' TCT AGA ATG GGA TCG GCC ATT GAA CA 3'
NeoRev	5' GTC GAC TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG G 3'
pROCKfw	5' TTG CTC TAT AAG TTG TCTTGT CTA GA 3'
pROCKrev	5' CGT TGC CTT GGA GTC GTA AA 3'
ATMparcialNEsmF (localização cassete em ATM+/-)	5' GCG GTG CTT CTC CTA ATC GA 3'
HigroIntR1 (localização cassete em ATM+/-)	5' AGC TGA AAG CAC GAG ATT CTT CG 3'
DMC1F	5' TCT AGA ATG CAG CAC GCA GGC AC 3'
DMC1R	5' CTC GAG CTA CTC ACG TGC ATC AAC GA 3'

3.4. Transfecção e seleção de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Após aquisição do cassete sintetizado para o superexpressor de TcDMC1, bactérias competentes *Escherichia coli* XL1-Blue (genótipo: *endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(Rk- Mk+)*) foram transformadas e após confirmação por PCR, algumas foram congeladas e outras utilizadas para extração em quantidade de DNA plasmidial seguida de digestão e precipitação de DNA.

Cerca de 15 µg de DNA plasmidial de superDMC1, foi digerido com a enzima NotI (Biolabs) overnight por 37° C, a fim de linearizar o vetor Prock para a etapa de transfecção. A reação de digestão foi realizada conforme orientação dos respectivos fabricantes. A enzima NotI utilizada no superDMC1, cliva o Prock dentro da sequência gênica da beta-tubulina de *T. cruzi*, facilitando a inserção do gene no genoma do parasito. Em seguida, o DNA digerido foi precipitado utilizando isopropanol e acetato de sódio 3M e solubilizado em 5 µl de água milliQ estéril.

As transfecções dos cassetes do superDMC1, do vetor vazio pROCKGFPNeo e do MOCK (controle negativo sem DNA) em células de *T. cruzi* foram realizadas por eletroporação

no aparelho Nucleofactor™ 2b Device (Lonza), onde foram utilizados 4×10^7 parasitos selvagens em fase exponencial de crescimento para cada transfecção.

As células foram centrifugadas, lavados duas vezes com PBS 1X estéril e ressuspensas em 80 ml de tampão TbBSF 1X estéril (90 mM NaPO₄, 5 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 50 mM HEPES pH 7,3). Aos 5 ml da digestão precipitada foram adicionados 7,5 ml de água miliQ estéril e 7,5 ml de TbBSF 3X estéril, totalizando 20 ml de DNA que foram adicionados aos 80 ml de células. O volume total foi transferido para cubetas de 0,2 cm (Sigma-Aldrich) e o programa U033 foi selecionado no aparelho Nucleofactor™ 2b Device (Lonza) utilizado na eletroporação dos parasitos.

Quanto ao processo de seleção dos parasitos transfectados, 24 horas após eletroporação, as células foram submetidas a tratamentos com antibiótico de seleção Neomicina (G418- Gibco) e Higromicina (Invitrogen), na concentração de 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, a fim de se obter clones transformados. Após a primeira semana, as células foram repassadas para meio novo com antibiótico dando início ao processo de seleção dos parasitos. A partir da 3ª semana não foi mais possível observar células vivas no MOCK (controle negativo), diferente do observado para as células transformadas, indicando que a seleção ocorreu de forma satisfatória.

3.5. Radiação gama

Células de *Trypanosoma cruzi* ($2 \times 10^7/\text{ml}$ em 5ml de LIT) foram submetidas a uma dose de 500Gy de radiação gama, dose previamente determinada em estudos anteriores do nosso grupo (REGIS-DA-SILVA et al., 2006). Os parasitos foram expostos a raios gama oriundos de uma fonte de cobalto (60Co), disponível no CNEN/CDTN, Instituto de Pesquisa do Ministério de Ciência e Tecnologia localizado no *campus* da UFMG. A taxa de dose utilizada neste trabalho foi de 500Gy/h. Após irradiação, as culturas foram utilizadas em ensaios de curva de sobrevivência, extração de proteínas e extração de RNA. Os controles negativos foram células “sham-irradiadas”, onde células do parasito foram submetidas as mesmas condições metodológicas dos irradiados, desde o meio de cultivo até o transporte ao CDTN, porém sem entrar na sala de irradiação (dose recebida: 0 Gy).

3.6. Metil metano sulfonato (MMS) e Hidroxiuréia (HU)

Para as curvas de sobrevivência das células heminocutes de ATM, utilizou-se agentes genotóxicos como o MMS (metil metano sulfonato) e Hidroxiúreia, os quais implicam em colapso da forquilha de replicação, levando a quebras simples e dupla na molécula de DNA. As células foram tratadas com 1,5 Mm de MMS em meio LIT a 28°C por 1 hora. Logo em seguida, foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio fresco. Para os ensaios com hidróxureia, as células foram incubadas com 20Mm de HU em meio LIT a 28°C por 24 horas, sendo em seguida lavadas com PBS e também ressuspensas em meio fresco para as devidas análises.

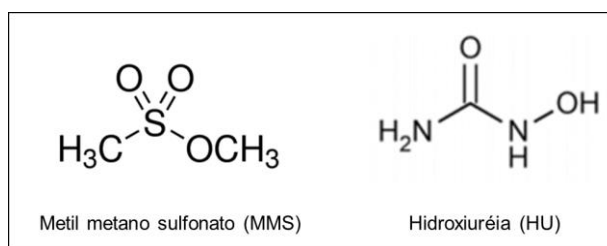


Figura 8 – Fórmula estrutural dos agentes químicos Metil metano sulfonato e Hidroxiureia, utilizados no trabalho.

3.7. Análise de Yh2a fosforilada - Western Blot

A fim de estimar o nível de quebras-dupla no DNA dos parasitos induzidas por radiação gama (500Gy), as células foram lisadas e extratos proteicos foram coletados em diferentes tempos após radiação (30 minutos, 1h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h).

3.7.1. Extração e quantificação de proteínas

Após serem submetidas a 500Gy de radiação gama, 1×10^8 células de cada cultura em fase exponencial foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas em PBS por duas vezes e lisadas com 100 µl de tampão de lise 2X (10 mM Na_2HPO_4 , 1% SDS, 1% de beta-mercaptoetanol, 6M uréia em pH 7,4). 1% de inibidor de protease (Merck) foi adicionado ao tampão apenas no momento da coleta e 0,2% de azul de bromofenol foi adicionado as amostras após a quantificação de proteínas.

As suspensões foram então sonicadas (Fisher Scientific™ Model 505 Sonic Dismembrator) a 30% da amplitude máxima por 5 ciclos de 20 segundos, com um intervalo de 20 segundos entre cada ciclo. Após o processo de sonicação, o lisado foi armazenado no -80°C até o momento do uso.

A concentração proteica foi determinada pelo método Bradford conforme indicações do fabricante. Cada amostra proteica foi dosada em triplicata. A curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações de BSA (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0 mg. mL⁻¹) também em triplicata. A leitura da absorbância foi feita a 595 nm no aparelho Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTeK). A quantidade de proteína em cada amostra foi estimada com base na equação linear da reta obtida através da curva de calibração.

3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As proteínas foram separadas de acordo com o protocolo de eletroforese SDS-PAGE (Sambrook e Russell, 2001) em tampão de amostra Laemmli 2x (1M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 20% glicerol; 0,5M EDTA pH 8,0; azul de bromofenol; betamercaptoetanol). Os extratos foram descongelados no gelo, fervidos durante 5 minutos e 2 µg de proteínas foram aplicadas no gel (gel *stack* de 1,5 mm a 5% e um gel de separação de 1,5 mm a 15%). A corrida foi realizada a 125 volts utilizando o tampão Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,01% e pH 8,3) por aproximadamente 2h. Foram produzidos dois géis, um para transferência em uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e outro, réplica corado por incubação em Coomassie Blue (0,25% Coomassie Brilliant Blue G-250, 50% metanol e 10% ácido acético) por 1h e descorado *overnight* (metanol 30% e ácido acético 10%).

3.7.3. ImunoBlotting

Após a corrida o gel foi incubado durante 10 minutos no tampão de transferência (30 mM Glicina, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% metanol) e a membrana de PVDF lavada com metanol e em seguida água milli-Q. Foi utilizado um sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), durante 1h a 300 mA, seguindo as instruções de montagem do fabricante. A membrana foi brevemente corada com uma solução de Ponceau S (0,2% Ponceau S, 5% ácido acético glacial) para verificar a qualidade da transferência e em seguida descorada com três lavagens em água milli-Q.

Posteriormente, foi realizada a incubação em uma solução de bloqueio a temperatura ambiente por duas horas ou overnight, contendo o tampão TBST (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM cloreto de sódio, 0.1% Tween 20) e 5% de BSA ou leite em pó desnatado. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos em TBST e incubada com uma solução do

anticorpo primário anti- γ H2A rabbit (1:3000) cedido pelo Dr Richard McCulloch (University of Glasgow) em 5% de BSA ou leite em pó desnatado. O anticorpo primário foi incubado por 3h ou overnight. Para avaliar expressão de proteína endógena, a membrana também foi incubada com anticorpo primário anti- α Tubulina mouse (1:10000). Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com TBST e incubação por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:15000) conjugado com peroxidase (Sigma Immuno Chemicals) e anti-IgG de camundongo (1:5000) conjugado com peroxidase (Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab) diluídos em TBST. Após a incubação, foram realizadas três lavagens em TBST e a membrana foi revelada usando o sistema Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) no equipamento ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare).

A quantificação relativa de H2A fosforilada foi medida com base na densidade relativa da histona fosforilada em relação a proteína endógena α -tubulina através do programa ImageJ. Posteriormente os valores obtidos foram comparados entre as células irradiadas e o controle não irradiado.

3.8. Extração de RNA total e confirmação dos superexpressores – RT-qPCR

A fim de analisar a expressão de alguns genes envolvidos direta ou indiretamente no processo de reparo (DMC1, RAD51 e ATM), os RNAs totais de células irradiadas foram extraídos após 4h e submetidos ao processo de síntese de cDNA e análise por PCR em tempo real. A técnica de RT-qPCR também foi utilizada para confirmação das células superexpressoras de DMC1 e RAD51 (Dm28c).

3.8.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído de $0,5 \times 10^8$ células de epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento pelo método do TRIzol (Invitrogen). As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific) a uma absorbância de 260nm. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 2% e após confirmação da qualidade, o RNA foi tratado com DNAase TURBO DNA-free™ Kit (Ambion), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida os RNAs foram submetidos a uma reação de PCR a fim de confirmar a ausência de DNA genômico na amostra.

3.8.2. Síntese de cDNA

Após confirmação da ausência de DNA genômico nas amostras, partiu-se então para a síntese de cDNA (1 μ g de RNA como molde) utilizando o Kit Super Script III First – Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) conforme indicações do fabricante.

3.8.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para os primers de RAD51, ATM e GAPDH utilizados na reação de RT-qPCR, as curvas de eficiência já haviam sido feitas previamente em trabalhos anteriores realizados pelo grupo: gene RAD51 (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006), gene GAPDH (ARAÚJO *et al.*, 2011) e gene ATM (Tese Costa-Silva, 2019).

A fim de testar a eficiência dos primers desenhados neste trabalho para TcDMC1, foi realizada uma curva de eficiência contendo diferentes concentrações de cDNA das cepas Dm28c WT (50ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng, 1,56 ng, 0,78 ng e 0,39 ng). Foram consideradas aceitáveis as eficiências entre 90% e 110%, sendo escolhido para os ensaios o conjunto de primers com eficiência de 105% (RT TcDMC1 144).

As reações de RT-qPCR foram feitas com o Power SYBR™ Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) sendo utilizado 5 ng de cDNA, 300 nM de cada primer (Tabela 3), 5 μ L de Mix SYBR 2X (Applied Biosystems) e água deionizada estéril para completar um volume final de 10 μ L. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto cada, seguidos por um último ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 95°C por 15 segundos. Para cada placa foi utilizado um controle negativo sem cDNA (água estéril) com a finalidade de avaliar possíveis contaminações e formação de dímeros pelos conjuntos de primers utilizados. As reações foram realizadas no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em placas de 96 ou 384 poços. Após as reações, as curvas de dissociação dos produtos amplificados foram analisadas para detectar possíveis formação de dímeros e amplificações inespecíficas.

O método ddCt foi utilizado nas análises para determinar a expressão relativa dos transcritos. A normalização dos resultados foi feita em relação ao gene endógeno GAPDH (gene constitutivo).

Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT qPCR.

Primers	Sequência
RT TcRad51Fw	5' – GGC TGT CAA GGG TAT CAG TG – 3'
RT TcRad51Rev	5' – AAC CAC TGC GGA TGT AA GC – 3'
RT GAPDH2Fw	5'-CGGTGGACGGTGTGTCGGTG-3'
RT GAPDH2Rev	5'-CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG-3'
RT-ATMhemiNEsmF	5' CAC ATC GTG CGA TCG CCA TC 3'
RT-ATMhemiR	5' GAA CAA TGG CCG GCA TCT GC 3'
RT TcDMC1F	5' GGT GAC ACG CAT GAC AAC TGG AAG 3'
RT TcDMC1R	5' AAT TGA CAG GTC ACG CAG AGC G 3'

3.9. Ensaio de Fusão citoplasmática utilizando Cell Trace™ Assay

O reagente Cell Trace se difunde nas células e se liga de forma covalente a resíduos de aminas livres intracelular. O Carboxifluoresceína N Succinimidil Éster, conhecido como 5(6)-CFDA, SE, ou CFSE – é um corante permeante à base de fluoresceína, utilizado em ensaios de proliferação celular. Possui fórmula molecular: C₂₉H₁₉NO₁₁ e massa molecular: 557.46 g/mol.

O corante, sofre ação de esterases intracelulares, as quais clivam os grupos carboxilas tornando-o fluorescente. Além disso, o succinimidil do CFSE se liga de forma covalente aos grupos amina das proteínas presentes no citoplasma da célula, possibilitando que durante a divisão celular, o corante seja distribuído igualmente entre as células-filhas, (WALLACE et al., 2008). Neste trabalho foram utilizados os corantes CellTrace™ CFSE C34554, que emite fluorescência quando excitado a um comprimento de onda de 488nm e o CellTrace™ Yellow C34567, com fluorescência a 532-nm ou 561-nm.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL Brener e/ou Dm28c) foram incubadas separadamente com CellTrace CFSE e CellTrace™ Yellow (ThermoFisher) conforme instruções do fabricante. 1×10^7 células foram tratadas com 10mM dos respectivos corantes em PBS por 20min a 28 graus, protegido da luz. Em seguida, 5ml de LIT (10% de BSF) foram adicionados às células por 5 min, a fim de neutralizar o excesso de corante do meio. Logo após, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e ressuspensas em meio fresco. Para a metodologia de mistura, $0,5 \times 10^7$ células das populações tratadas com os diferentes marcadores foram misturadas em placas de 24 poços de forma que a concentração final foi de 1×10^7 por mistura. Após 24 horas as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% PBS até o momento de montagem das lâminas.

3.9.1. Imunofluorescência: Montagem e análise das lâminas – Cell Trace

Após 24h de mistura, os parasitos já fixados foram aderidos em lâminas de vidro (26x76mm) previamente tratadas com Poly-L-lisina (Sigma Aldrich) (1:10). Em seguida, as células já nas lâminas foram lavadas com PBS(1X), tratadas com 1,5 µg.ml⁻¹ de Dapi-VectaShield (Vector Laboratories) ou ProlongTM Gold Antifade (Thermo Scientific) e armazenadas a 4 °C protegidas da luz até o momento das análises por microscopia. Para os ensaios de cinética, os tempos analisados foram colhidos com 1h, 6h e 24h de mistura.

As lâminas foram fotografadas usando o microscópio de fluorescência Zeiss axio Very.A1 acoplado a uma câmera digital (AxioCam 503 mono) na objetiva de 100x, e analisadas usando o software ZenBlue 2.5 (Zeiss Software). Para o ensaio de hibridização utilizando CellTrace foram contadas 200 células por mistura, onde o objetivo era encontrar células amarelas, indicador de fusão citoplasmática entre os parasitos.

3.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prisma v7.04 (GraphPad Softwares. Inc.), por meio de *test-t* de *Student* sendo $p < 0,05$ o valor considerado como significativo. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes, exceto para a realização dos experimentos submetidos a radiação ionizante, onde apenas dois ensaios foram conduzidos. Os resultados mostrados nos gráficos correspondem às médias dos experimentos e as barras ao desvio padrão, sendo (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

3.11. Análises de Biologia Estrutural

Com o intuito de compreender as estruturas primárias, secundárias e terciárias das recombinases DMC1 e RAD51 de *Trypanosoma cruzi*, foram realizadas análises de bioinformática estrutural como: a modelagem comparativa e o *docking* molecular. Estas análises nos possibilitam caracterizar a relação estrutura-função destas proteínas em *T. cruzi*, contribuindo para o entendimento do trabalho como um todo.

3.11.1. Modelagem comparativa

A modelagem comparativa é considerada uma metodologia *in silico* de predição da estrutura tridimensional de proteínas e peptídeos para os quais ainda não possuem estrutura resolvida experimentalmente. A partir de softwares específicos e com base em parâmetros físicos-químicos das interações inter-residuais de um modelo já conhecido, a estrutura terciária de uma dada proteína pode ser determinada e consequentemente também a sua função. Neste trabalho foi realizada a modelagem comparativa das duas recombinases de *Trypanosoma cruzi*, DMC1 e RAD51, ambas envolvidas no processo de recombinação homóloga.

Para obtenção dos modelos TcRAD51 e TcDMC1 por modelagem comparativa foi utilizado o programa MODELLER v9.22, uma ferramenta de predição de estrutura tridimensional de proteínas (ŠALI; BLUNDELL, 1993), que tem como base o alinhamento entre a sequência da proteína alvo (a que se deseja modelar) e a sequência de uma proteína de referência com estrutura já conhecida (depositada no *Protein Data Bank*, PDB).

A referência utilizada para modelar a recombinase meiótica de *T. cruzi* foi a proteína DMC1 de humano (HsDMC1, modelo *Protein Data Bank*, PDB ID:1V5W⁵), a qual já é bem caracterizada bioquimicamente. O modelo 1V5W é referente a estrutura de um octâmero de HsDMC1 resolvido a partir da técnica de cristalografia de proteínas seguida por difração de raios-x com 3.20 angstroms de resolução (KINEBUCHI et al., 2004). Para a modelagem da recombinase RAD51, o modelo utilizado como referência foi um filamento pré-sináptico da proteína RAD51 de humano (HsRAD51, modelo PDB ID: 5JZC⁶). O modelo refere-se a um filamento helicoidal (RAD51-ssDNA) com estrutura resolvida por Cryo-EM com 4.20 angstroms de resolução (SHORT et al., 2016).

Utilizando os modelos de referência do PDB (1V5W e 5JZC) e a partir das sequências das proteínas DMC1⁷ e RAD51⁸ preditas para *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener Esmeraldo-like) retiradas do banco de dados de tripanossomatídeos (TrytripDB), foi realizada *in silico* a modelagem molecular com base em dez mil estruturas para ambas as recombinases.

O alinhamento das estruturas primárias com os modelos de referência foi realizado utilizando a função *alignment.salign ()*⁹ e para a geração dos modelos foi utilizado a função

⁵ Acesso disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1V5W>

⁶ Acesso disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/5JZC>

⁷ DMC1: <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/TcCLB.506885.310>

⁸ RAD51: <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/TcCLB.503801.30>

⁹ <https://salilab.org/modeller/9v1/manual/node263.html#CMD:alignment.align>

automodel ()¹⁰ descritos no manual do programa. Após o cálculo das 10.000 estruturas geradas foi selecionada a estrutura de menor valor de DOPE score (SHEN; SALI, 2006), estrutura esta que teve sua energia global minimizada pelo programa CHIMERA v1.13.1, usando campo de força AMBER ff99SB com parâmetros de 100 *steepest 57radient steps*, 0.02 s *teepest 57radient step* (Å), 10 *conjugate 57radiente steps*, 0.02 *conjugate 57radiente step size* (Å) e 10 *update interval*.

Após obtenção dos modelos minimizados, realizou-se a validação estrutural através da plataforma SAVES v6.0¹¹, utilizando os programas ERRAT (COLOVOS; YEATES, 1993) e PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993).

3.11.2. Docking Molecular

A ancoragem molecular (*Docking Molecular*) é uma técnica de predição de interação entre diferentes moléculas muito utilizada em análises de biologia molecular estrutural, em que é possível prever potenciais conformações de um determinado ligante em um sítio ativo específico de uma determinada proteína. Nas análises de *docking* molecular tem-se sempre um receptor e um ligante, os quais podem interagir das mais variadas formas (ASHUTOSH; VYTAS, 2018; MORRIS; LIM-WILBY, 2008). Neste trabalho foi realizado um *docking* molecular semiflexível de TcDMC1 e TcRAD51 com ssDNA com base em regiões de interações já conhecidas e discutidas na literatura para as recombinases de humano HsDMC1 (R236, L239, R242, Q244, P274 e G275) e HsRAD51 (R235, L238, M243, V273 e D274) (LUO et al., 2021).

Para realização do *docking* molecular, foi utilizado a última versão (v2.4) do programa HADDOCK (*High Ambiguity Driven biomolecular DOCKing*) (DE VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010; DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003; HONORATO et al., 2021) disponibilizado em servidor web¹². O HADDOCK 2.4 permite realizar o *docking* de proteínas com ácidos nucleicos e por isso foi utilizado neste trabalho. A ancoragem molecular foi realizada entre as recombinases (receptor) de *T. cruzi* e uma ssDNA (ligante flexível) composta por 4

¹⁰ <https://salilab.org/modeller/9v8/manual/node42.html>

¹¹ <https://saves.mbi.ucla.edu/>

¹² Disponível em: <https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>

nucleotídeos de timina (extraída da cadeia D do modelo PDB ID: 7C9C), conforme as orientações do programa ao usuário (guia prático¹³ e tutoriais¹⁴).

Para fins de validação dos parâmetros utilizados foi realizada previamente uma re-ancoragem (*re-docking*, do inglês), que consiste na realização de um *docking in silico* de uma estrutura tridimensional já resolvida do receptor com o ligante. Para isso foi utilizada a cadeia A da estrutura terciária 7C9C (complexo pré-sináptico de DMC1 de humano) como o receptor e uma molécula de DNA (cadeia D do modelo 7C9C) como ligante. Como resultado do *re-docking*, o HADDOCK calculou 150 estruturas que foram agrupadas em 10 clusters, sendo o cluster 1 o de melhor pontuação pelo HADDOCK (HADDOCK score - 67.4). A primeira estrutura do cluster 1, foi a escolhida para as análises de validação, a qual teve um RMSD de 0.297 Å quando alinhada estruturalmente com o 7C9C_D. Esse valor de RMSD indica que o modelo simulado pelo HADDOCK corresponde ao modelo observado experimentalmente (LUO et al., 2021) e, portanto, os mesmos parâmetros metodológicos utilizados no *re-docking*, também foram utilizados no *docking* de TcDMC1 e TcRAD51.

Tabela 3 - Valores de interação gerados pelo HADDOCK para o re-docking realizado

<i>Re-docking/ CLUSTER 1</i>	
HADDOCK score	-67.4 +/- 4.1
Tamanho do <i>cluster</i>	44
RMSD médio das estruturas de menor energia	0.4 +/- 0.3
Energia de Van der Waals	-36.8 +/- 1.8
Energia eletrostática	-183.9 +/- 21.8
Energia de dessolvatação	4.7 +/- 0.9
Energia de violação de restrições	14.7 +/- 13.3
Area de superfície analisada	972.5 +/- 66.0
Z-score	-1.7

¹³ disponível em: <https://www.bonvinlab.org/software/bpg/>

¹⁴ disponível em: <https://www.bonvinlab.org/education/HADDOCK24/>

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação de células de *T. cruzi* geneticamente modificadas

Em estudos de caracterização gênica, tem-se como estratégia analisar os possíveis efeitos da alteração a nível de transcrito gênico e com isso mensurar o papel do gene de interesse seja nocauteando ou superexpressando-o. As células geradas são então submetidas a diferentes ensaios metodológicos, o que permite uma caracterização fenotípica de cada organismo modificado. Neste trabalho foram utilizadas células de *Trypanosoma cruzi* previamente modificadas e também foi realizada a produção de novos parasitos.

A fim de estudar o papel do gene DMC1 em *T. cruzi*, células selvagens de Dm28c (Tcl), foram tranfectadas com o cassete de superexpressão (pROCKDMC1_Neo). Após três semanas foi possível obter células viáveis superexpressando o gene DMC1 na cepa não híbrida Dm28c, inicialmente confirmada por PCR convencional, visualizado em gel de agarose (Figura 9) e posteriormente confirmada por RTqPCR (Figura 10). Para fins de confirmação das células selecionadas, foi realizada PCR para o gene Neomicina, o qual amplifica um fragmento de 804pb. Foi utilizado como molde da reação, o DNA genômico (gDNA) de células transfectadas com o cassete de expressão (superDMC1), gDNA de células transfectadas apenas com o vetor pROCK vazio (pROCKGFPNEO) e o gDNA de células controle (MOCK, WT transfectadas apenas com tampão). Durante o processo de seleção, as células WT transfectadas apenas com o vetor de expressão pROCK vazio (pROCKGFPNEO), como já esperado, não apresentaram alterações no padrão de crescimento em cultura quando comparadas ao controle WT, confirmando a eficácia do vetor utilizado e a não interferência do mesmo no crescimento dos parasitos. Decidiu-se então usar células WT (não transfectadas) como controle em todos os ensaios posteriores com células superDMC1.

Conforme ilustrado na figura 9A, as células superDMC1 apresentam o gene de resistência ao antibiótico de seleção NEO, confirmando assim a eficiência na transfecção do cassete de expressão. A figura 9 (B e C) apresenta a correta localização da inserção de DMC1 no cassete de expressão onde é possível observar a amplificação do fragmento de 1079pb (figura 9B) referente a combinação dos iniciadores DMC1F (início da sequência gênica de DMC1) e pROCK R (região intergênica de GAPDHII presente no vetor pROCK). Também pode ser visualizada a amplificação de um fragmento de 2504pb referente a combinação dos

iniciadores DMC1F e NeoR (final da sequência gênica de Neomicina), conforme o esquema de clonagem ilustrado na figura 9C.

Na figura 10 é possível observar os resultados de transcrição gênica para DMC1 em células modificadas. Nos três experimentos realizados de forma independente (Figura 10A) com um valor de expressão em média 10 vezes maior quando comparado com as células Dm28c WT (controle não transfectado), diferença estatisticamente significativa (Figura 10B). Confirmando assim a construção de células de *Trypanosoma cruzi* superexpressoras do gene meiótico DMC1.

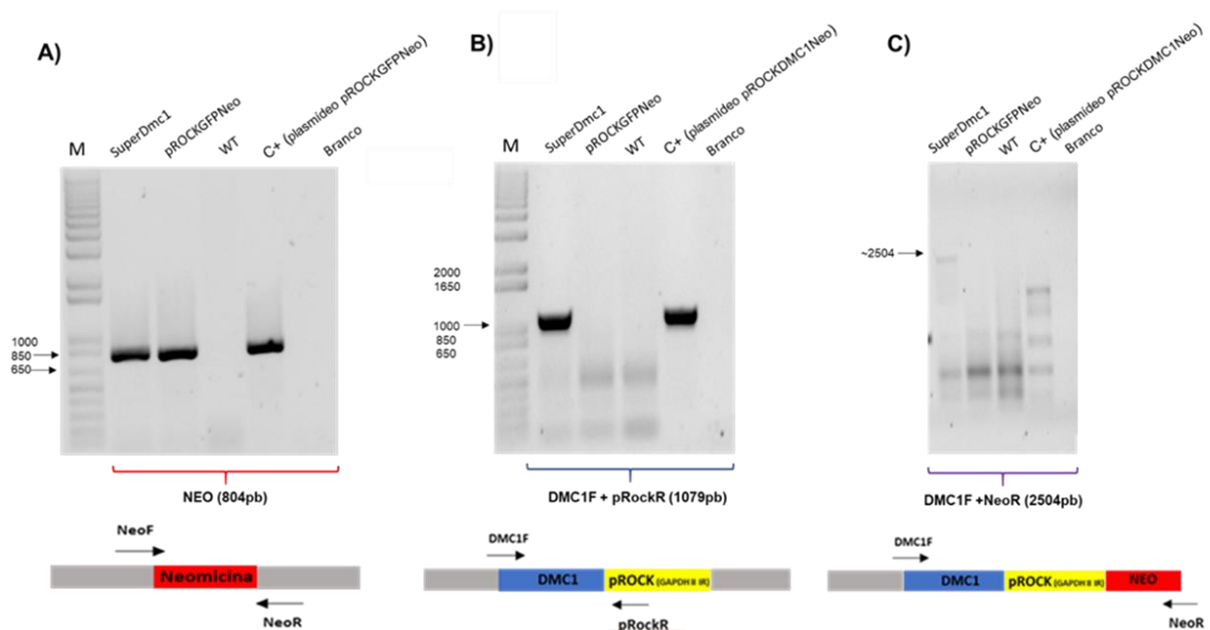


Figura 9- Confirmação de células superexpressoras de DMC1 por PCR convencional. Reações de PCR realizadas com gDNA de células transformadas com o inserto (SuperDMC1), gDNA de células controle transformadas sem o inserto (pROCKGFPNeo), gDNA de células Dm28c WT e com DNA plasmidial como controle positivo para Neo e DMC1 (pROCKGFPNeo e pROCKDMC1Neo). **A:** Amplificação do fragmento referente ao gene de seleção (NEO- Neomicina), ausente no WT e presente no parasito superexpressor de DMC1 (superDMC1). **B:** Amplificação do fragmento referente a combinação dos iniciadores DMC1 Foward e pROCK Reverse, mostrando a correta localização da inserção gênica no vetor pROCK. **C:** Amplificação do fragmento referente a combinação dos iniciadores DMC1 Foward e Neo Reverse, mostrando a correta localização da inserção gênica no vetor pROCK.

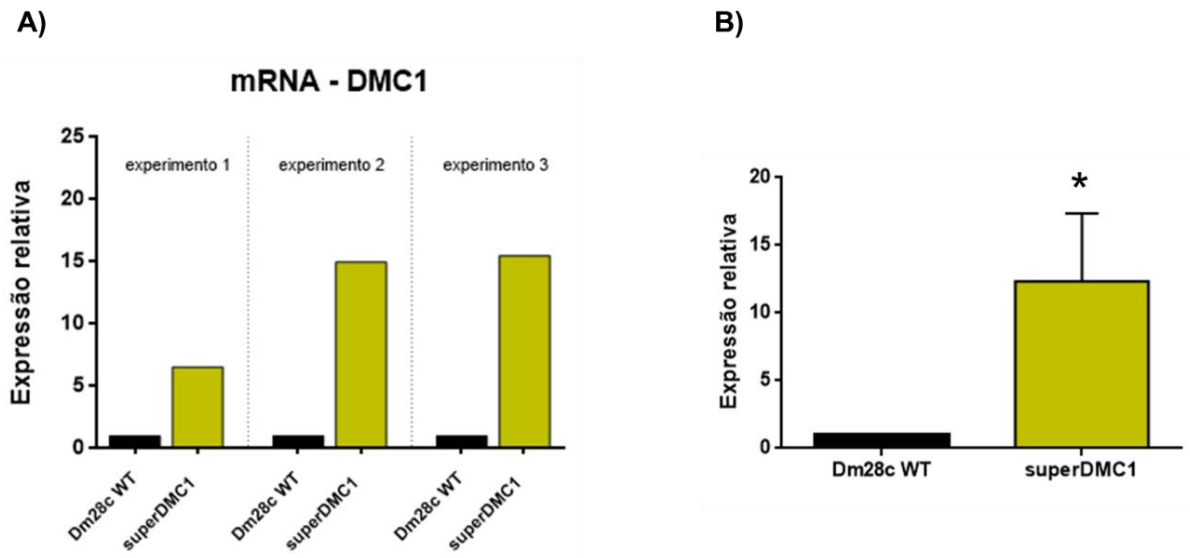


Figura 10 - Confirmação de células superexpressoras de DMC1 por RTqPCR. Expressão relativa do transcrito de DMC1 em células transformadas (superDMC1) em relação às células selvagens (Dm28c WT). **A:** Superexpressão do gene de meiose em células de *T. cruzi* geneticamente modificadas visualizada em três experimentos realizados de forma independente. **B:** média da superexpressão de DMC1 com diferença estatística significativa, $p = 0,0174$. (* $p < 0,05$, teste *t-student*).

Após confirmação de células de *T. cruzi* superexpressoras de DMC1 na cepa Dm28c, partiu-se então para a construção de células superexpressoras de RAD51 também na cepa Dm28c. O cassete pROCKRAD51Higro, construído em trabalho anterior, foi confirmado neste trabalho por PCR convencional quanto ao seu antibiótico de seleção (Figura 11A) e em seguida transfectado nas cepas CL Brener e Dm28c. Após seleção com higromicina, as células superexpressoras de RAD51 foram confirmadas por PCR em tempo real, conforme figura 11. Para a cepa CL Brener foram realizados apenas dois experimentos biológicos não sendo possível assim obter uma validação estatística, porém, os níveis de RAD51 mostraram-se elevados em ambas duplicatas biológicas (Figura 11B). Para a cepa Dm28c foi possível observar níveis elevados do transcrito de RAD51 nos três experimentos realizados (Figura 11C) com uma média de expressão com diferença estatística significativa nas células superexpressoras quando comparada com as células controle Dm28c pROCK, apresentando uma expressão média de 10 vezes a mais que o WT (figura 11D). Esses resultados confirmam a superexpressão da recombinase RAD51 em *Trypanosoma cruzi*.

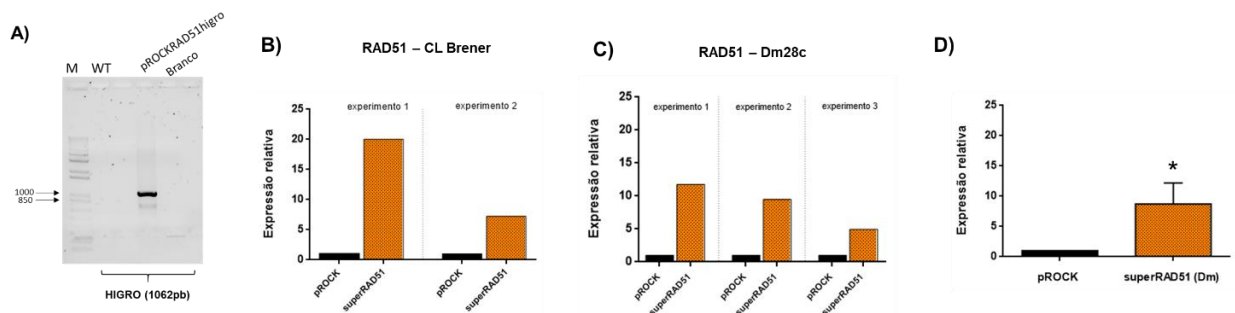


Figura 11 - Confirmação de células superexpressoras de RAD51 por RTqPCR. **A:** Amplificação do fragmento referente ao gene de seleção (HIGRO - Higromicina) de 1062pb, ausente no WT e presente no plasmídeo de transfecção pROCKRAD51higro. **B:** Expressão relativa do transcrito de RAD51 observada em dois experimentos realizados com células transformadas (superRAD51) em relação às células controle, transfectadas apenas com o vetor vazio (pROCKGFPigro), em CL Brener. **C:** Expressão relativa do transcrito de RAD51 em células transformadas (superRAD51) em relação às células controle na cepa Dm28c WT, confirmando a superexpressão do gene de recombinação homóloga RAD51 em três experimentos independentes com células de *T. cruzi* geneticamente modificadas. **D:** média da superexpressão de RAD51 (Dm28c) com diferença estatística significativa, $p = 0,0180$. * $p < 0,05$, teste t-student.

Como já citado anteriormente, quando há quebra dupla na molécula de DNA, os mecanismos de resposta ao dano (DDR) são ativados por proteínas sensoras que recrutam os transdutores e consequentemente os efetores da via de reparo. ATM é o transdutor primário de resposta a DSB e com o intuito de estudar o seu papel em *Trypanosoma cruzi*, células heminocautas para o domínio cinase do gene (dominante negativo), foram utilizadas aqui neste trabalho. Antes de serem empregadas em diferentes ensaios metodológicos, as células heminocautas para ATM foram confirmadas em experimentos independentes (Figura 12A) com um valor de expressão reduzido para o transcrito referente ao domínio cinase de ATM em ambos os experimentos. As células de *T. cruzi* heminocautas para o domínio cinase de ATM foram então confirmadas com um valor médio de expressão relativa pela metade, estatisticamente significativo, quando comparadas as células selvagens da cepa CL Brener (Figura 12B).

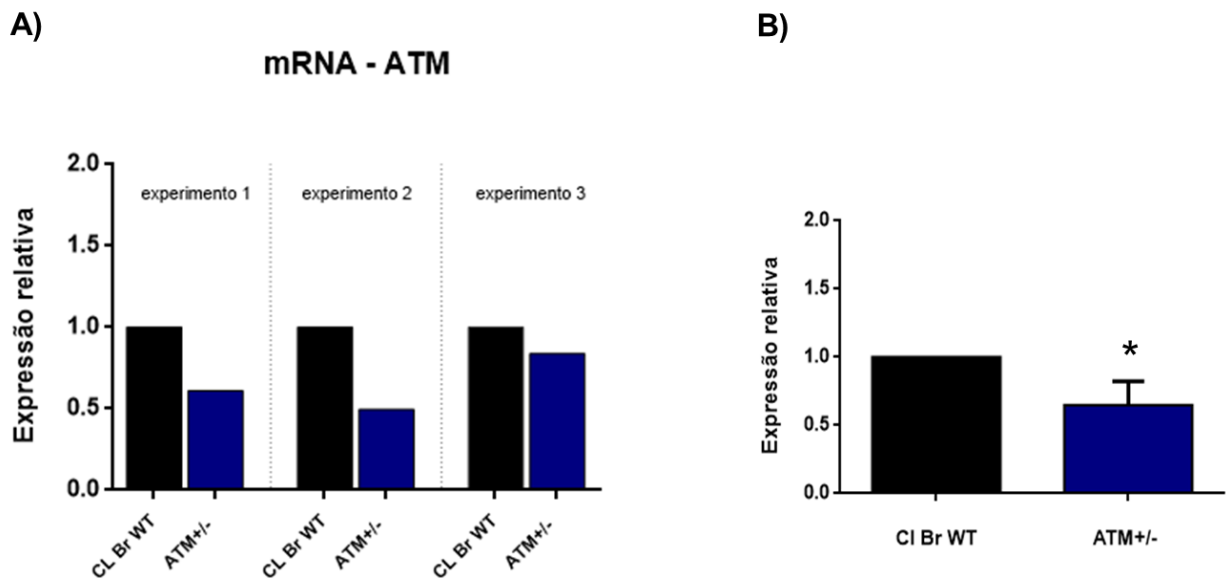


Figura 12 - Confirmação de células de *T. cruzi* heminocautes para ATM por RTqPCR. A: Análise da expressão do transcrito de ATM (domínio cinase) em células selvagens (CL Br WT) e mutantes (ATM+/-) em três experimentos realizados de forma independente. **B:** Células de *T. cruzi* dominante negativo para ATM com diferença estatística significativa com $p = 0,0252$ (* $p < 0,05$, teste t-student).

4.2. Estudo de fenótipos dos parasitas modificados

Com o propósito de caracterizar fenotipicamente as células superDMC1 e observar se o fato de *T. cruzi* superexpressar um gene de meiose iria interferir de alguma forma no seu crescimento em cultura, diversas curvas de crescimento foram montadas e analisadas por até 6 dias. Contudo, não foram observadas diferenças no padrão de crescimento entre as células superexpressoras de DMC1 (superDMC1) e o WT (Dm28c), sugerindo que a superexpressão do gene DMC1 não interfere no crescimento das células (Figura 13A).

Para as células superexpressoras de RAD51 tanto na cepa Dm28c (Figura 13C) como na cepa CL Brener (Figura 13D) foi possível observar um padrão de crescimento similar ao do WT, mostrando que a superexpressão do gene RAD51 em células de *T. cruzi* também parece não interferir no crescimento do parasito.

Já quando analisado o padrão de crescimento de células heminocautes para o domínio cinase de ATM (ATM+/-), foi observado um perfil diferenciado em relação as células selvagens CL Brener (Figura 13B). O experimento foi realizado 5 vezes e tanto células WT como células modificadas foram crescidas e analisadas sob as mesmas condições. Partindo da mesma concentração de células (1×10^7 /ml) e contadas nos mesmos dias as células deficientes em

ATM apresentaram uma cinética de crescimento mais lenta, o que mostra a importância do gene ATM em *T. cruzi*.

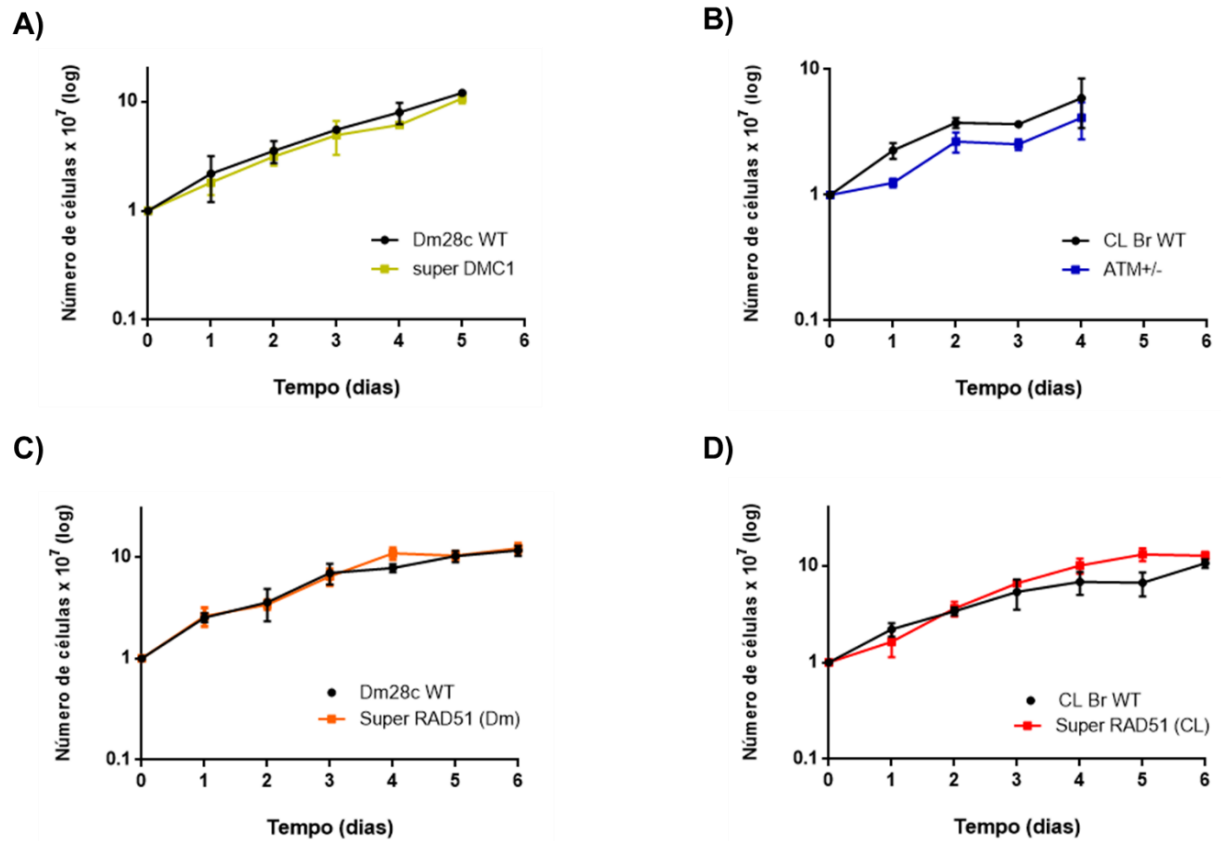


Figura 13 - Curvas de crescimento das células de *T. cruzi* modificadas. Avaliação do perfil de crescimento das células de *T. cruzi* superexpressoras de DMC1 (superDMC1), superexpressoras de RAD51 em diferentes cepas (SuperRAD51 Dm28c e superRAD51 CL Brener) e heminocautes para o domínio cinase de ATM (ATM+/-). O crescimento das células modificadas foi analisado ao longo de 6 dias e comparado com os seus respectivos WTs (Dm28c e CL Brener) **A:** A linha amarelada representa o crescimento de superDMC1 e a linha preta o crescimento do WT. Para este ensaio foram realizados no mínimo 4 experimentos, não havendo diferença entre o perfil de crescimento das células modificadas e do controle. **B:** A linha azul representa o crescimento de ATM+/- e a linha preta o crescimento do WT (cepa CL Brener). Foram realizadas 5 replicatas biológicas, com diferença entre o perfil de crescimento das células modificadas e do controle. **C:** células superRAD51 em Dm28c, representada pela linha laranja e células selvagens Dm28c representada pela linha preta. Curva realizadas em duplicata biológica onde não houve diferença entre as células superRAD51 (Dm) e o WT. **D:** células superRAD51 em CL Brener, representada pela linha vermelha e células CL Brener WT representadas pela linha preta. As curvas foram realizadas em duplicatas biológicas não havendo diferença entre o perfil de crescimento das células superRAD51 (Dm) e as células selvagens (Dm28c).

Como foi visto que células ATM+/- apresentaram um crescimento naturalmente prejudicado, e sabendo-se que ATM é o principal transdutor de sinal ao reparo de DSBs, decidiu-se então analisar o fenótipo de *T. cruzi* modificados quando submetidos a radiação gama, que causam quebras duplas no DNA. As DSBs são reparadas principalmente por proteínas da via de recombinação homóloga, portanto, analisar o crescimento dos parasitas modificados após serem irradiados permite inferir sobre o papel dos genes no reparo HR destes organismos.

A fim de verificar o papel de DMC1 no reparo a DSBs, as células superexpressoras do gene de meiose foram submetidas a 500Gy de radiação gama. Células de *T. cruzi* selvagens quando irradiadas com 500Gy apresentam um padrão de crescimento característico, com uma parada no crescimento quando comparadas às células não irradiadas. As células superexpressoras do gene meiótico DMC1, analisadas neste trabalho, não apresentaram alteração na cinética de crescimento durante duas semanas após serem submetidas a radiação gama, sendo que os parasitos superDMC1 cresceram a um ritmo muito semelhante ao da cepa controle irradiado (Figura 14A). O fato da superexpressão da recombinase DMC1, específica de meiose, não implicar na cinética de crescimento dos parasitos após serem irradiados, abre margem para especulação sobre a ineficiência de DMC1 no reparo HR de *Trypanosoma cruzi*.

De forma diferente das células superexpressoras de DMC1, as células heminocautes para ATM apresentaram uma cinética de crescimento muito discrepante do controle irradiado (Figura 14B). Conforme as curvas de sobrevivência, após serem irradiadas com 500Gy, as células ATM+/- assim como o WT permaneceram paradas por alguns dias e só então retomaram o crescimento. As ATM+/- retardaram o seu crescimento por duas semanas apresentando uma cinética de retomada bem lenta em relação ao controle também irradiado. Estes experimentos foram realizados em quatro replicatas biológicas onde em todas elas foi possível observar as células ATM+/- com um crescimento praticamente estagnado por até 15 dias, o que reflete o papel fundamental da atividade cinase de ATM em *Trypanosoma cruzi*.

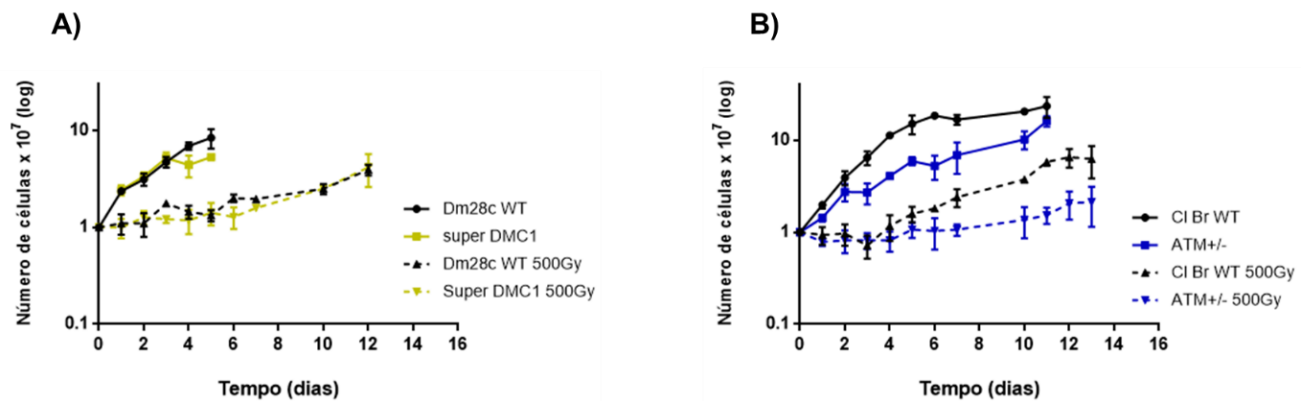


Figura 14 - Curva de sobrevivência de células de *T. cruzi* SuperDMC1 e ATM+/- irradiadas com 500Gy de radiação gama. A: O crescimento foi acompanhado ao longo de duas semanas, mostrando que superexpressar o gene de meiose DMC1 não afeta a cinética de crescimento dos parasitos quando submetidos a radiação. Foram realizados 5 experimentos, não havendo diferença entre o perfil de sobrevivência das células modificadas (superDMC1) e do controle (Dm28c). **B:** perfil de crescimento acompanhado ao longo de duas semanas, mostrando que as células heminocautes para ATM possui uma cinética de crescimento completamente alterada quando submetidas a radiação. Foram realizados 4 experimentos independentes, onde o padrão de crescimento das células ATM+/- irradiadas em relação ao WT (cepa CL Brener) irradiado mostrou-se prejudicado em todos eles.

Como foi observado que células heminocautes para a atividade cinase da ATM apresentaram um crescimento prejudicado quando submetidas a radiação gama, buscou-se analisar também quais seriam as respostas destas células quando na presença de outros agentes genotóxicos como MMS e hidroxiuréia, os quais implicam direta ou indiretamente em parada da replicação celular, podendo ocasionar DSBs.

Com o intuito de avaliar a resposta do parasito ATM+/- ao MMS foram realizados ensaios de sobrevivência, onde as células foram tratadas com 1,5mM da droga por 1 hora e acompanhadas quanto ao seu crescimento por até uma semana. Os resultados, observados para células selvagens CL Brener tratadas, mostraram uma parada no crescimento do parasito com retomada após 24h. Retomada esta que não pôde ser observada para as células ATM+/-, as quais apresentaram um crescimento desfavorável quando tratadas com MMS, sendo nítida a forma prejudicada de recuperação do crescimento dessas células quando comparada as células WT tratadas (Figura 15A). Ao comparar o padrão de crescimento das células ATM+/- tratadas com as células ATM não tratadas, também é visível o quanto as células heminocautes que já apresentam um crescimento naturalmente mais lento são extremamente afetadas pelo agente alquilante MMS.

Já para as células ATM+/-, tratadas com 20mM de HU, não foram observadas diferenças no crescimento quando comparadas ao controle também tratado (Figura 15B), sugerindo que o estresse replicativo gerado por HU em *Trypanosoma cruzi* não tem o envolvimento de ATM.

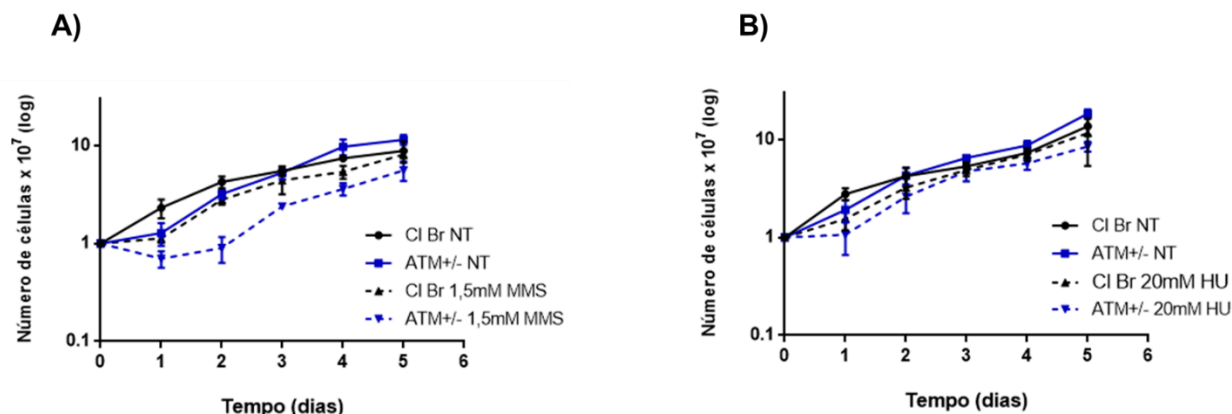


Figura 15 - Curva de sobrevivência de células de *T. cruzi* ATM+/- tratadas com MMS e HU. O crescimento dos parasitas selvagens e modificados foi acompanhado ao longo 5 dias, após tratamento com 1,5mM de MMS (metilmetanosulfoanto) por 1h e 20mM de hidroxiureia (HU) por 24h. **A:** As células heminocutes para ATM tratadas com MMS representadas no gráfico pela linha tracejada em azul (ATM+/- 1,5Mm MMS) apresentaram um perfil de crescimento alterado quando comparadas ao WT tratado, representado pela linha tracejada preta (CI Br 1,5mM MMS). Foram realizadas três curvas de sobrevivência independentes com o mesmo perfil de crescimento. **B:** As células heminocutes para ATM tratadas com HU representadas no gráfico pela linha tracejada em azul (ATM+/- 20mM HU), não apresentaram diferença no perfil de crescimento quando comparadas às células WT tratadas (CL Br 20Mm HU), representadas pela linha tracejada preta. Para este experimento foram realizadas cinco curvas de sobrevivência independentes.

Sabendo-se do papel de ATM como transdutor primário na via de reparo a DSB e diante dos resultados obtidos com as células de *T. cruzi* deficientes para a atividade cinase de ATM, procurou-se saber de que forma a cinética de recombinação estaria interferindo no reparo por recombinação homóloga nas células de *T. cruzi* irradiadas. Para isso foram realizados ensaios de cinética de DSBs causadas pela radiação ionizante em *T. cruzi* modificados, utilizando anticorpos anti- γ H2A de *Trypanosoma brucei*.

4.3. Cinética de reparo a DSB alterada em células de *T. cruzi* modificadas

Após células de *T. cruzi* modificadas serem submetidas a 500Gy de radiação gama, seu extrato proteico foi analisado quanto aos níveis de γ H2A em diferentes tempos, ao longo de 5 dias. A expressão relativa da histona fosforilada nas células irradiadas foi normalizada em relação ao controle não irradiado em todos os ensaios.

Inicialmente foi realizada uma comparação entre as quantificações relativas da histona fosforilada nas diferentes cepas utilizadas neste trabalho, CL Brener WT e Dm28c WT, as quais se diferenciam quanto a sua variabilidade genética, sendo CL Brener uma cepa híbrida e Dm28c não híbrida. Como é possível observar na figura 16 (C e F), a quantidade de γ H2A foi maior nos tempos iniciais de 1h e 24h em ambas as cepas, no entanto a partir de 30min após irradiação já foi possível observar a presença da histona H2A fosforilada (Figura 16 B e E). As curvas de sobrevivência das células selvagens irradiadas demonstram como a sinalização por H2A interfere na retomada do crescimento em *T. cruzi*. Em CL Brener, no experimento 1 é possível observar uma sinalização para DSB mais rápida, com o nível de γ H2A mais acentuado no tempo de 30min (Figura 16B), do que a observada no experimento 2. Essa sinalização mais eficiente logo após irradiação é refletida no perfil de crescimento das células CL Brener irradiadas (Figura 16A), com uma retomada de crescimento e recuperação mais rápida quando comparada a CL Brener do experimento 2 (Figura 16D). O mesmo pode ser observado para a cepa Dm28c, onde os níveis de H2A fosforilada foram maiores no tempo de 30min do experimento 2 (Figura 16E), compatível com uma melhor retomada de crescimento dessas células, observada na curva de sobrevivência do experimento 2 (Figura 16D). Ao comparar a cinética de sinalização entre as cepas, foi possível observar que CL Brener apresentou maiores níveis de γ H2A do que a cepa Dm28c em todos os tempos analisados, fato que se repetiu nas duas replicatas biológicas (Figura 16C e F). No entanto, ambas as cepas continuaram com sinais da histona fosforilada por até 120h mesmo após a retomada do crescimento.

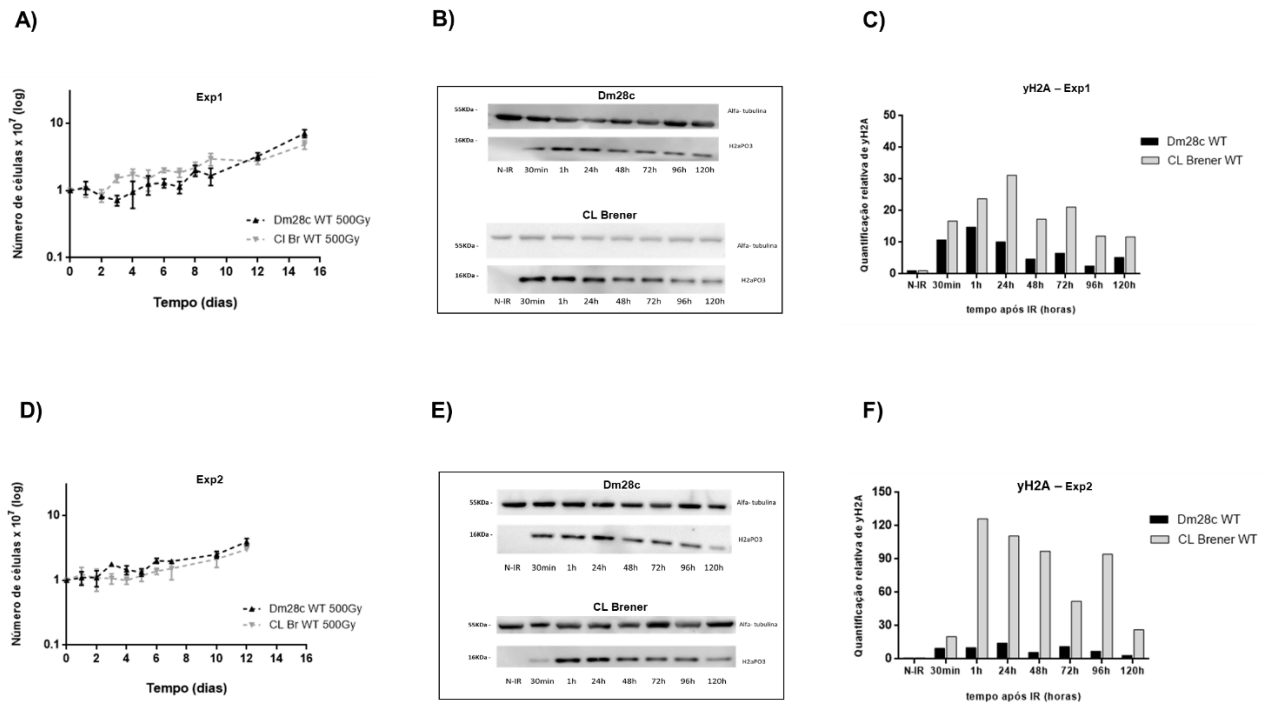


Figura 16 - Expressão de yH2A fosforilada nas cepas Dm28c e CL Brener de *T. cruzi*. Comparação dos níveis de yH2A entre a cepa híbrida de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) e a cepa não híbrida (Dm28c). **A e D:** duplicatas experimentais das curvas de sobrevivência das células selvagens de *T. cruzi* submetidas a 500Gy de radiação gama (A: experimento 1 e D: experimento 2). **B e E:** Duplicatas experimentais de membranas de *Western Blot* para yH2A em células WT Dm28c e CL Brener não irradiadas (N-IR) e irradiadas, analisadas em diferentes tempos. (B: experimento 1 e E: experimento 2). **C e F:** Duplicatas experimentais da expressão relativa de yH2A, em Dm28c e CL Brener após irradiação (C: experimento 1 e F: experimento 2).

Em células superDMC1, construídas na cepa Dm28c, foi possível observar uma rápida sinalização em ambos os experimentos realizados. As células superDMC1 apresentaram um pico nos níveis de yH2A 30 minutos após irradiação, diferente do WT Dm28c que apresentou maiores níveis de H2A nos tempos de 1h e 24h. Para as células superexpressoras de DMC1, a forma como a sinalização para o reparo das DSBs via histona fosforilada ocorre, parece também interferir no crescimento desses organismos, pois quando no experimento 1, as células superDMC1 apresentaram níveis de H2A mais acentuados nos tempos iniciais de 30min, 1h e 24h (Figura 17B), uma melhor retomada de crescimento foi observada na sua curva de sobrevivência (Figura 17A), diferente do observado no experimento 2 (Figura 17D e E). Ao comparar os valores da quantificação de yH2A entre as superDMC1 e as células selvagens Dm28c, observou-se maiores níveis da histona fosforilada nas células

superexpressoras do gene de meiose, em ambas duplicatas realizadas (Figura 17C e F), sugerindo assim que essas células talvez apresentem uma maior quantidade de DSB que as células selvagens.

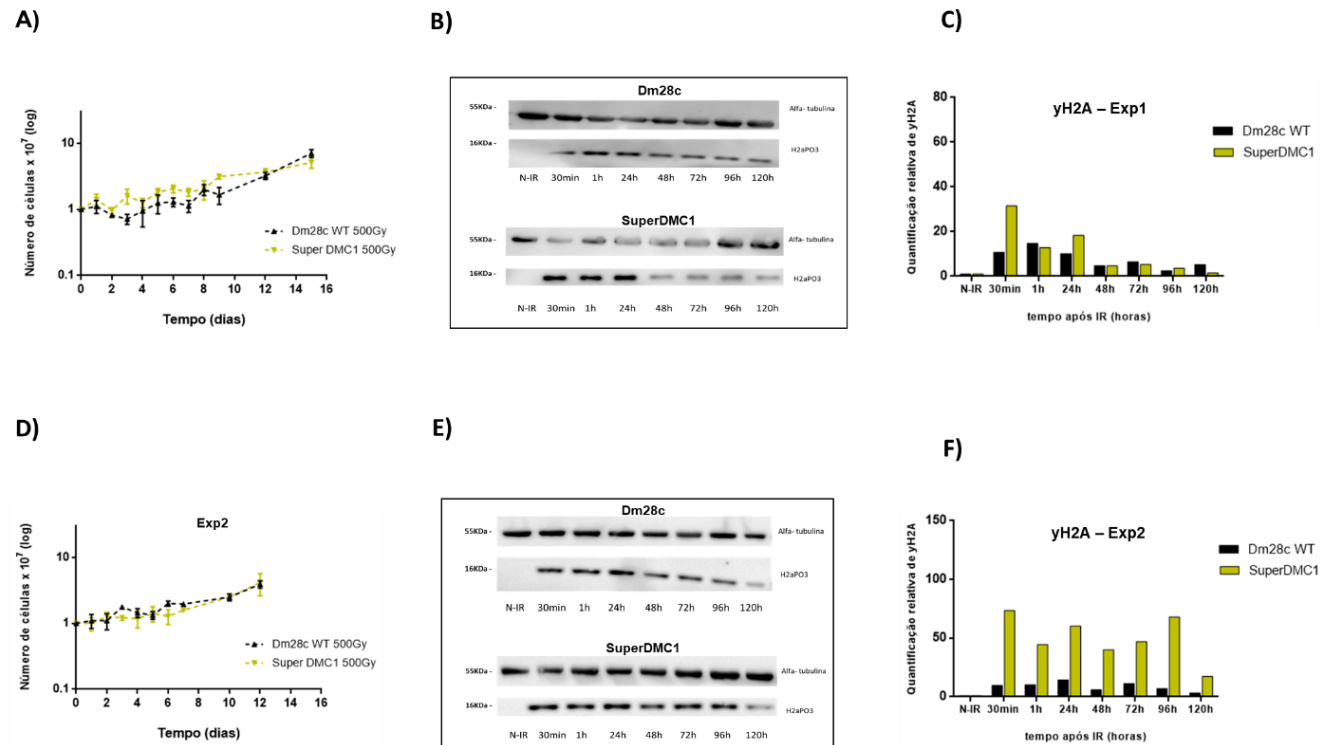


Figura 17 - Expressão de yH2A fosforilada em *T. cruzi* superexpressor de DMC1. Comparação dos níveis de yH2A entre células de *Trypanosoma cruzi* modificada (SuperDMC1) e entre células selvagens Dm28c. **A e D:** duplicatas experimentais das curvas de sobrevivência das células superDMC1 e Dm28c de *T. cruzi* submetidas a 500Gy de radiação gama (A: experimento 1 e D: experimento 2). **B e E:** Duplicatas experimentais de membranas de *Western Blot* para yH2A em células superDMC1 e Dm28c não irradiadas (N-IR) e irradiadas, analisadas em diferentes tempos. (B: experimento 1 e E: experimento 2). **C e F:** Duplicatas experimentais da expressão relativa de yH2A em superDMC1 e Dm28c após irradiação (C: experimento 1 e F: experimento 2).

Já para as células deficientes em RAD51, a cinética de reparo mostrou-se bem diferente da cinética das células selvagens CL Brener. Com um padrão similar nos dois experimentos realizados. As células Rad51+/- irradiadas apresentaram níveis de histona fosforilada já nos tempos iniciais, porém os níveis são sempre menores que a célula selvagem e com um pico tardio (24h) nos níveis de yH2A. Perceptivelmente, as células apresentaram uma drástica diminuição de H2A nos tempos subsequentes (Figura 18B e E). Células Rad51+/- possuem uma depleção na eficiência do reparo por HR, o que pelo visto parece

interferir de alguma forma na sinalização primária da via de resposta a DSBs. Interferência esta que acaba refletindo na curva de sobrevivência destas células ao longo dos dias, as quais apresentam uma estagnação na curva de crescimento (Figura 18A e D).

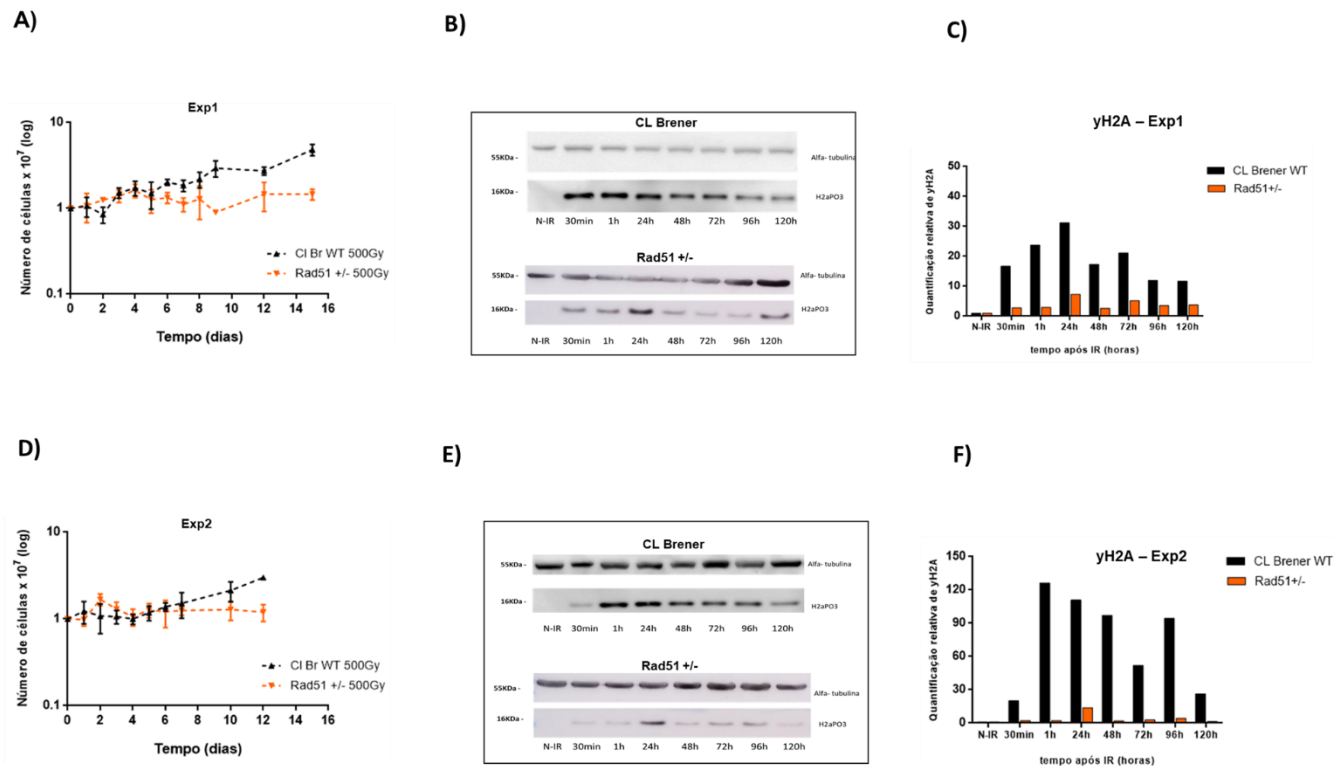


Figura 18 - Expressão de yH2A fosforilada em *T. cruzi* heminocautes para RAD51. Comparação dos níveis de yH2A entre células de *Trypanosoma cruzi* modificada (Rad51+/-) e entre células selvagens CL Brener. **A e D:** duplicatas experimentais das curvas de sobrevivência das células RAD51+/- e CL Brener de *T.cruzi* submetidas a 500Gy de radiação gama (A: experimento 1 e D: experimento 2). **B e E:** Duplicatas experimentais de membranas de *Western Blot* para yH2A em células Rad51+/- e CL Brener não irradiadas (N-IR) e irradiadas, analisadas em diferentes tempos. (B: experimento 1 e E: experimento 2). **C e F:** Duplicatas experimentais da expressão relativa de yH2A em Rad51+/- e CL Brener após irradiação (C: experimento 1 e F: experimento 2).

As células de *T. cruzi* ATM+/-, as quais apresentam uma depleção da atividade cinase de ATM, apresentaram picos de H2A em momentos distintos nos dois experimentos realizados. No experimento 1, as células ATM+/- apresentaram maiores níveis de yH2A já nos primeiros 30min, seguida de uma redução acentuada para todos os tempos seguintes analisados (Figura 19B e C). Já no experimento 2, as células deficientes para ATM apresentaram um pico na quantidade de histona fosforilada bem acentuado em 48h (Figura

19E e F). As células ATM +/- após irradiadas apresentaram uma parada na curva de crescimento por até duas semanas em ambas as duplicatas experimentais (Figura 17A e D), independente da sinalização inicial mais acentuada no tempo de 30min observada no experimento 1 (Figura 19B). Ao comparar os valores da histona fosforilada entre as células, foi possível observar que as células deficientes para a atividade cinase de ATM apresentaram níveis menores de γ H2A do que as células selvagens, quando irradiados (Figura 19C e F), sugerindo uma deficiência na sinalização primária das DSBs e consequentemente, um reparo prejudicado, similar ao que foi visto na célula deficiente em Rad51+/-.

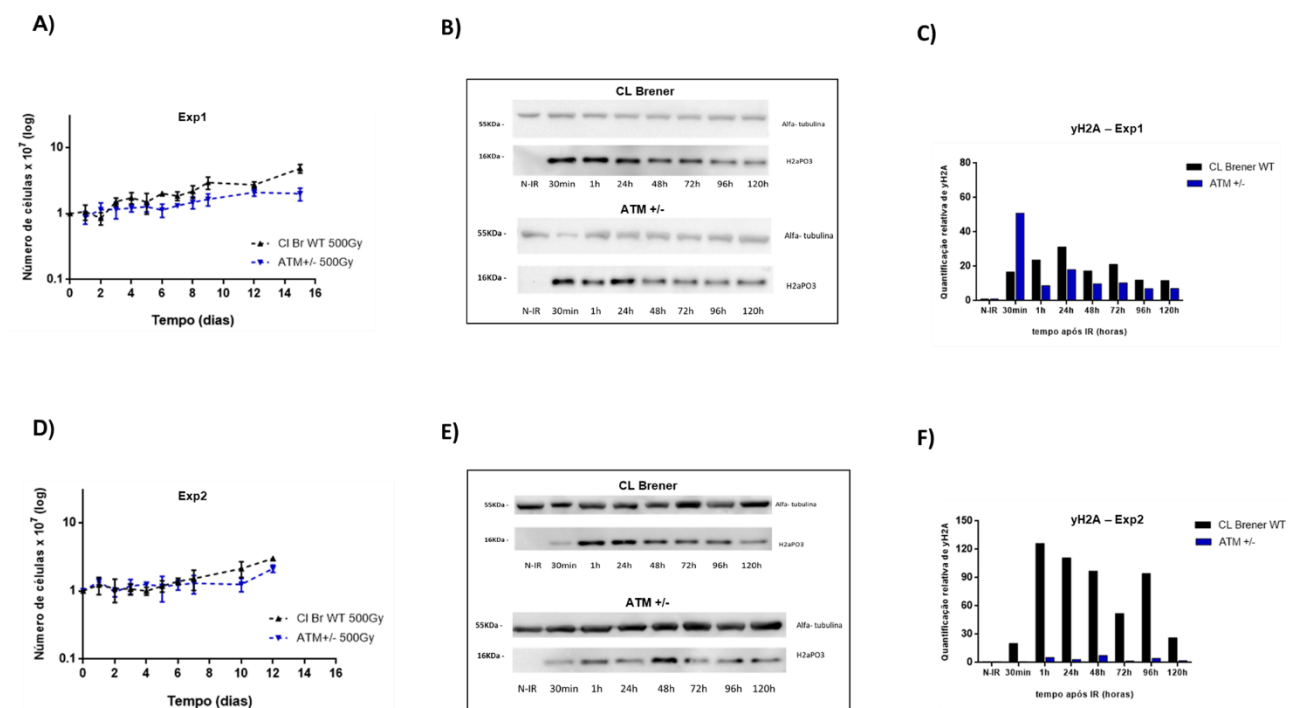


Figura 19- Expressão de γ H2A fosforilada em *T. cruzi* heminocautes para a atividade cinase de ATM. Comparação dos níveis de γ H2A entre células de *Trypanosoma cruzi* modificada (ATM +/-) e entre células selvagens CL Brener. **A e D:** duplicatas experimentais das curvas de sobrevivência das células ATM +/- e CL Brener de *T. cruzi* submetidas a 500Gy de radiação gama (A: experimento 1 e D: experimento 2). **B e E:** Duplicatas experimentais de membranas de Western Blot para γ H2A em células ATM +/- e CL Brener não irradiadas (N-IR) e irradiadas, analisadas em diferentes tempos. (B: experimento 1 e E: experimento 2). **C e F:** Duplicatas experimentais da expressão relativa de γ H2A em ATM +/- e CL Brener após irradiação (C: experimento 1 e F: experimento 2).

4.4. Expressão de DMC1 elevada em células de *T. cruzi* selvagem e heminocautes para RAD51 e ATM

Com o intuito de analisar a expressão dos genes em estudo neste trabalho (DMC1, RAD51 e ATM), células de *T. cruzi* geneticamente modificadas foram submetidas a extração de RNA seguida de ensaios de PCR em tempo real onde a expressão relativa dos transcritos envolvidos na recombinação foi avaliada segundo o método ddCt.

Considerando DMC1 um gene de recombinação específico de meiose e o fato da recombinase RAD51 em outros organismos também ser utilizada durante a meiose como um fator acessório, foram avaliadas aqui as possíveis formas de regulação gênica entre essas duas recombinases de *T. cruzi*.

Inicialmente, a expressão do transcrito de DMC1 foi analisada nas cepas selvagens Dm28c e CL Brener, onde foi possível observar um aumento na expressão relativa de DMC1 na cepa híbrida CL Brener em relação a cepa não híbrida Dm28c (Figura 20B). No entanto, houve uma grande variação nos valores de expressão entre as replicatas biológicas, não sendo possível observar uma diferença estatística. Dos seis experimentos realizados, um apresentou nível de expressão de DMC1 similar entre as cepas, com todos os outros apresentando níveis de expressão em CL Brener acima dos níveis encontrados em Dm28c, chegando a uma expressão relativa de até onze vezes mais na cepa híbrida (Figura 20A). Essa observação indica que os níveis da recombinase meiótica DMC1 devem estar mais elevados em cepas híbridas.

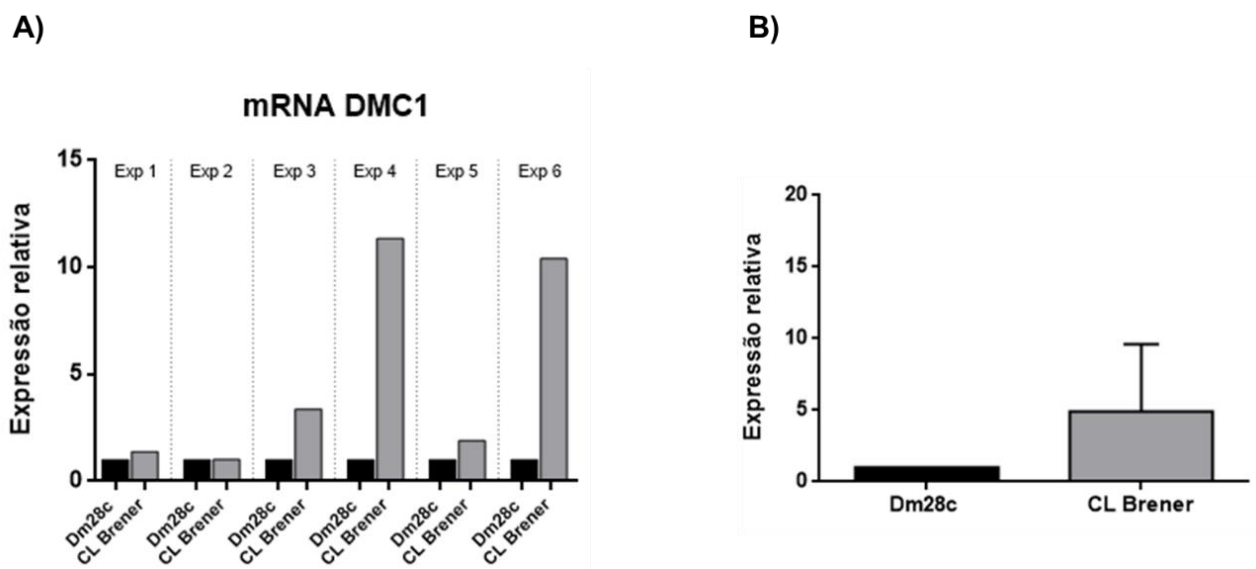


Figura 20 - Expressão do transcrito de DMC1 em cepas híbrida e não híbrida de *Trypanosoma cruzi*. Análise da expressão gênica do gene meiótico em células de *T. cruzi* selvagens; cepa Dm28c (não híbrida) e cepa CL Brener (híbrida). Experimento realizado em seis replicatas biológicas, sem diferença estatística.

Em seguida, a expressão de DMC1 foi analisada em células do parasito superexpressoras de RAD51 tanto na cepa CL Brener quanto em Dm28c. Como observado na figura 21 (A e B para CL Brener; C e D para Dm28c), a expressão de DMC1 nesses parasitos não apresentou diferença estatística. A média da expressão relativa de DMC1 nas células superRAD51 foi semelhante a expressão nas células selvagens, o que induz a acreditar que o fato dos parasitos superexpressarem a recombinase RAD51 em seu genoma não interfere diretamente na regulação da expressão basal do transcrito de meiose DMC1.

No entanto, já para as células heminocutes para RAD51 e ATM, a expressão de DMC1 parece estar sendo regulada de alguma forma. As replicatas biológicas que foram realizadas três vezes, evidenciaram diferenças na expressão gênica relativa de DMC1 em células de *T. cruzi* Rad51^{+/-} e ATM^{+/-}, variando entre níveis de expressão semelhantes ao WT e de três a quatro vezes acima dele (Figura 21E e F). A expressão do transcrito de DMC1 nessas células sofreu uma variação considerável entre as replicatas, sugerindo que pode existir uma regulação “fina” do gene de meiose em momentos específicos das células.

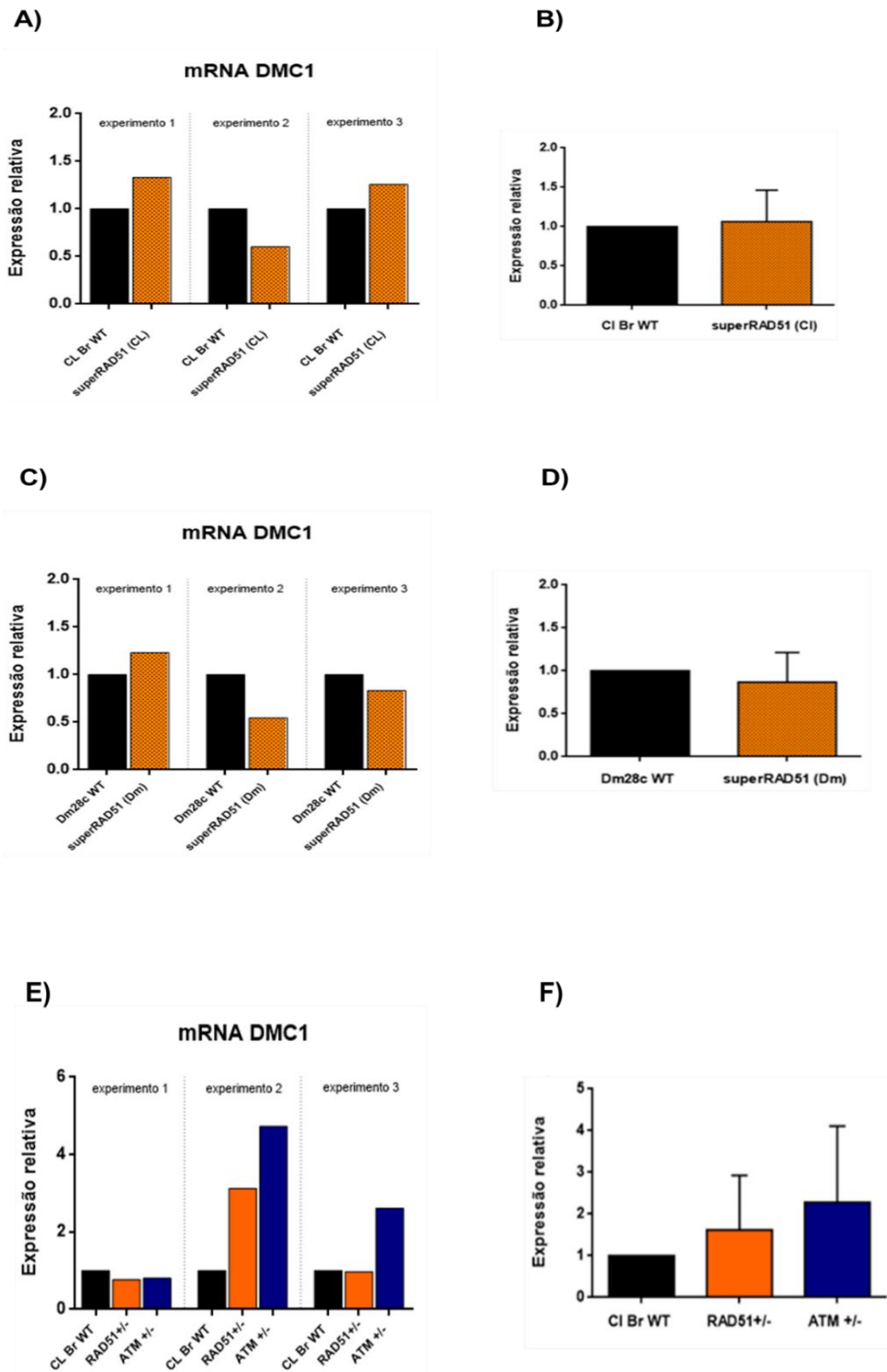


Figura 21 - Expressão do transcrito de DMC1 em *Trypanosoma cruzi* modificados. Análise da expressão gênica do gene meiótico em células de *T. cruzi* transformadas. **A:** expressão de DMC1 em

células superexpressoras de RAD51 na cepa CL Brener observada em três experimentos independentes, sem diferença estatística. **B**: média da expressão de DMC1 na cepa CL Brener, sem diferença estatística. **C**: expressão de DMC1 em células superexpressoras de RAD51 na cepa Dm28c, analisadas em três experimentos. **D**: média da expressão de DMC1 na cepa Dm28c, sem diferença estatística. **E**: expressão de DMC1 nas células heminocautes para RAD51 e ATM observada nas triplicatas biológicas. **F**: média da expressão de DMC1 em células Rad51+/- e ATM +/-, sem diferença estatística.

4.5. Expressão de RAD51 é alterada em células ATM+/-

Também foi analisada a expressão do transcrito de RAD51 em células superexpressoras de DMC1 e heminocautes para ATM. Conforme pode ser observado nas diferentes replicatas experimentais realizadas com as células superDMC1 (Figura 22A) e em concordância ao que foi visto na figura 21, a superexpressão de DMC1 parece não influenciar a expressão de RAD51 e vice-versa, sugerindo mais uma vez que a superexpressão dessas recombinases não interfere na expressão gênica basal uma da outra em condições normais, não apresentando diferenças estatísticas significativa (Figura 22B).

Quanto as células heminocautes para a atividade cinase de ATM, apesar dos resultados não apresentarem diferença estatística, foi possível observar um aumento na expressão da recombinase RAD51 (Figura 22C e D). Dos quatro experimentos analisados, dois apresentaram uma expressão de RAD51 com níveis acima do encontrado no WT e os outros dois, com uma expressão semelhante ao WT. Sugerindo que a enzimas de recombinação RAD51 podem estar sendo requeridas em células ATM+/-.

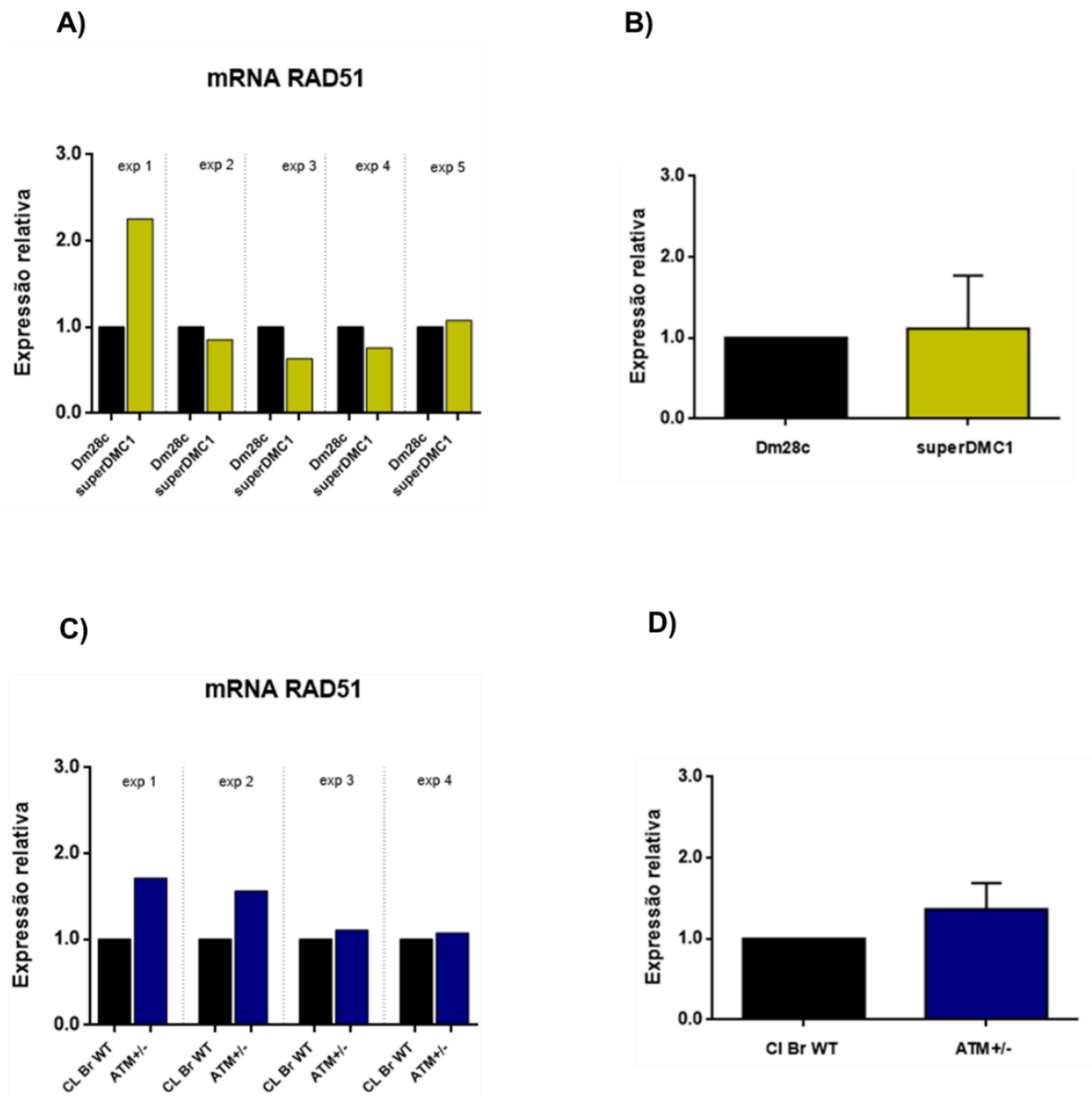


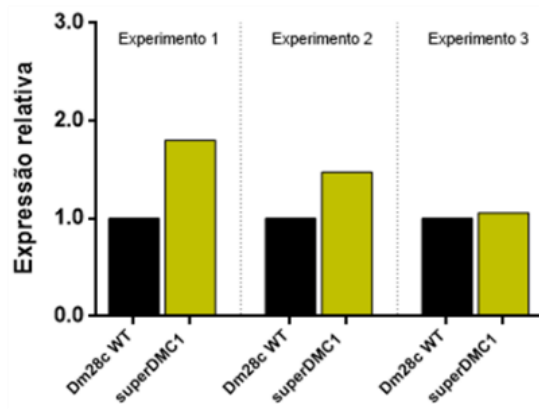
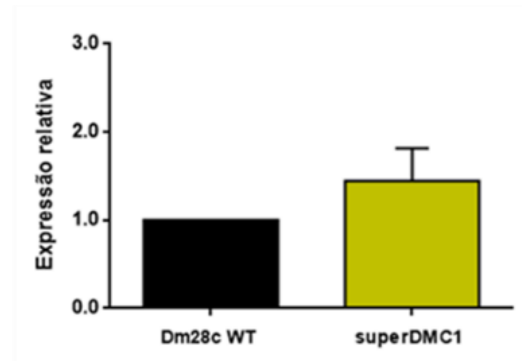
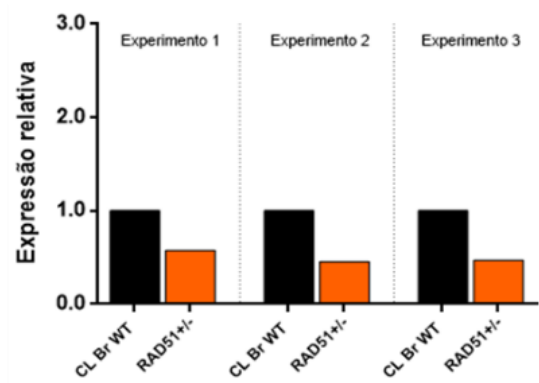
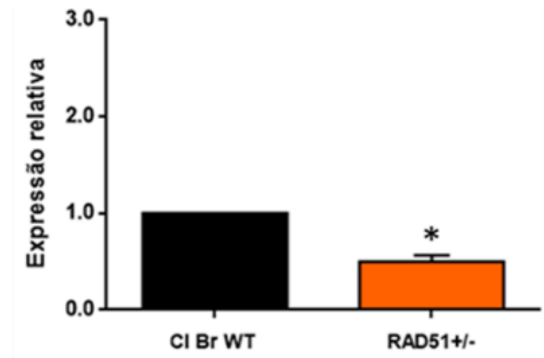
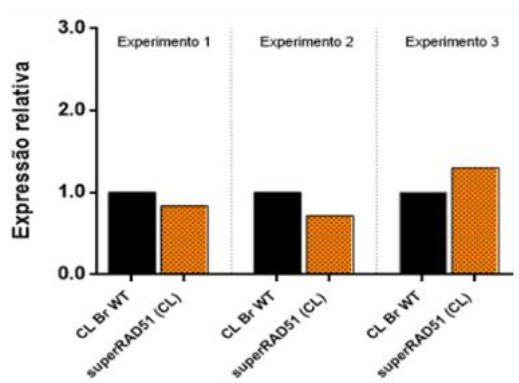
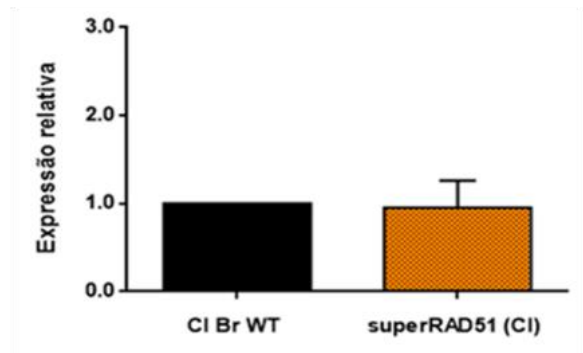
Figura 22 - Expressão do transcrito de RAD51 em células de *Trypanosoma cruzi* modificadas. A: Análise da expressão gênica de RAD51 em parasitos modificados superexpressando o gene DMC1 nas diferentes replicatas biológicas realizadas. **B:** expressão de RAD51 em células heminocautes para ATM observada nas quadruplicatas biológicas. Não foram observadas diferença estatísticas em ambas as células modificadas.

4.6. Expressão de ATM elevada em células superDMC1 e reduzida em células modificadas para RAD51.

Como visto até agora, a proteína ATM também parece desempenhar um papel crucial na via de reparo por recombinação homóloga em *T. cruzi*. Analisar a expressão desse gene nas células modificadas para as recombinases DMC1 e RAD51, que se encontram no final da via de recombinação, pode fornecer informações adicionais sobre o processo de sinalização em *Trypanosoma cruzi*.

Desta forma, quando analisada a expressão do transcrito de ATM em células superexpressoras do gene meiótico DMC1, observou-se que há uma propensão das células em também superexpressar o gene ATM. Apesar da não diferença estatística (Figura 23B), os experimentos realizados em triplicatas biológicas mostraram que por duas vezes a expressão de ATM nas células superDMC1 esteve acima da média da expressão de ATM no WT (Dm28c) (Figura 23A). Sugerindo que o fato da célula superexpressar o gene de meiose DMC1 pode estar interferindo de forma indireta no início da via, ou no que diz respeito a quantidade de DSBs geradas para induzir recombinação.

Já as células comprometidas para RAD51 apresentaram uma expressão relativa de ATM pela metade (Figura 23C e D), indicando que a deficiência da recombinase regula de alguma forma a expressão gênica da principal proteína transdutora de sinal a DSB, ATM, o que reafirma uma possível regulação entre ATM e as recombinases de *T. cruzi*. No entanto, a expressão média relativa de ATM em superRAD51 na cepa CL Brener não apresentou diferença quando comparada ao WT (Figura 23E e F). Já quando a superexpressão de RAD51 acontece na cepa Dm28c, a expressão de ATM parece ser reduzida praticamente pela metade (Figura 23H). Apesar da não diferença estatística, duas das três replicatas, apresentaram níveis de ATM pela metade quando comparadas ao WT (Dm28c) (Figura 23G). Isso talvez indique que a regulação entre ATM e essas recombinases possa estar ocorrendo de forma diferente entre as cepas híbridas e não híbridas de *T. cruzi*.

A)**mRNA ATM****B)****C)****mRNA ATM****D)****E)****mRNA ATM****F)**

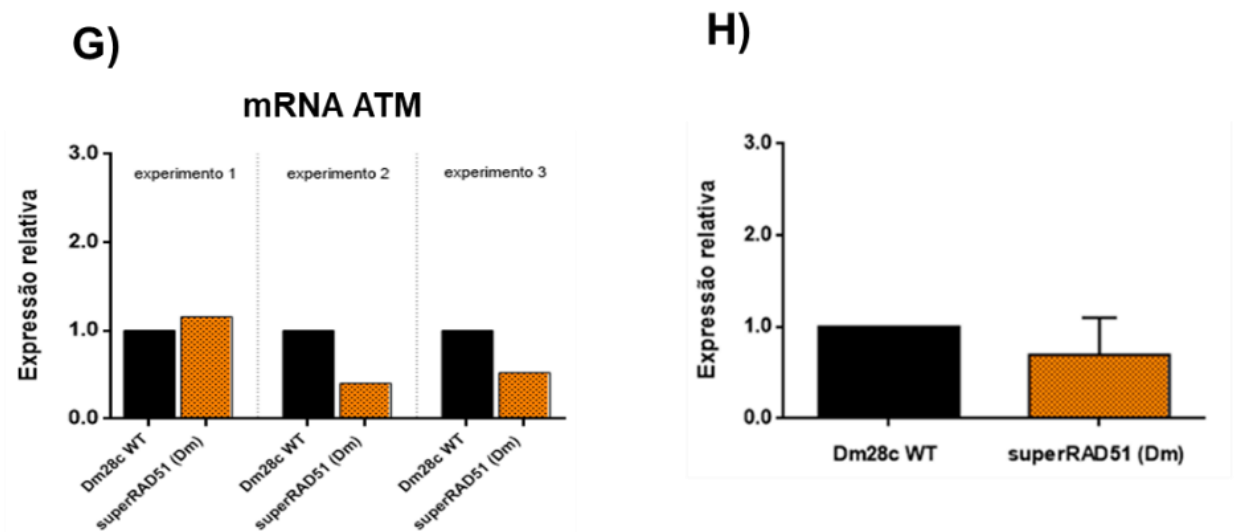


Figura 23 - Expressão do transcrito de ATM em células de *Trypanosoma cruzi* modificadas. **A:** Análise da expressão gênica da cinase ATM em células de *T. cruzi* superexpressoras da recombinase DMC1, nas diferentes replicatas biológicas. **B:** média da expressão de ATM em células superDMC1, sem diferença estatística. **C:** expressão de ATM em células heminocautes para a recombinase RAD51 realizada em três experimentos independentes. **D:** média da expressão de ATM em células Rad51+/- com diferença estatística quando comparado ao controle (Dm28c), com $p = 0.0059$. (* $p < 0,05$, teste t-student). **E:** expressão de ATM em células superexpressoras de RAD51 na cepa CL Brener. **F:** média de ATM em células superRAD51 (CL), sem diferença estatística. **G:** expressão de ATM em células superexpressoras de RAD51 em Dm28c. **H:** média de ATM em células superRAD51 (Dm), sem diferença estatística.

4.7. Aumento na expressão de DMC1 e redução de ATM em células de *T. cruzi* irradiadas

Ao analisar a expressão relativa do transcrito DMC1 nas células de *T. cruzi* selvagens e modificadas, quatro horas após irradiação, foi visto um aumento na expressão dessa recombinase. Nas duas replicatas biológicas, praticamente todas as células analisadas apresentaram uma expressão de DMC1 aumentada quando comparada a células não irradiadas, com exceção das células superDMC1, que não apresentou diferença na expressão do transcrito (Figura 24A), o que pode ser devido ao fato das células já superexpressarem a recombinase de meiose. Esses resultados sugerem que DMC1 pode estar sendo requerida pela maquinaria de recombinação nas primeiras 4h após irradiação, tanto em células selvagens como em células transformadas.

Ao analisar a expressão de ATM nas células 4h após serem irradiadas, as duas replicatas biológicas apresentaram uma redução na expressão da cinase tanto nas células selvagens Dm28c WT e CL Brener WT quanto nas células superDMC1 e ATM+/- (Figura 24C e D).

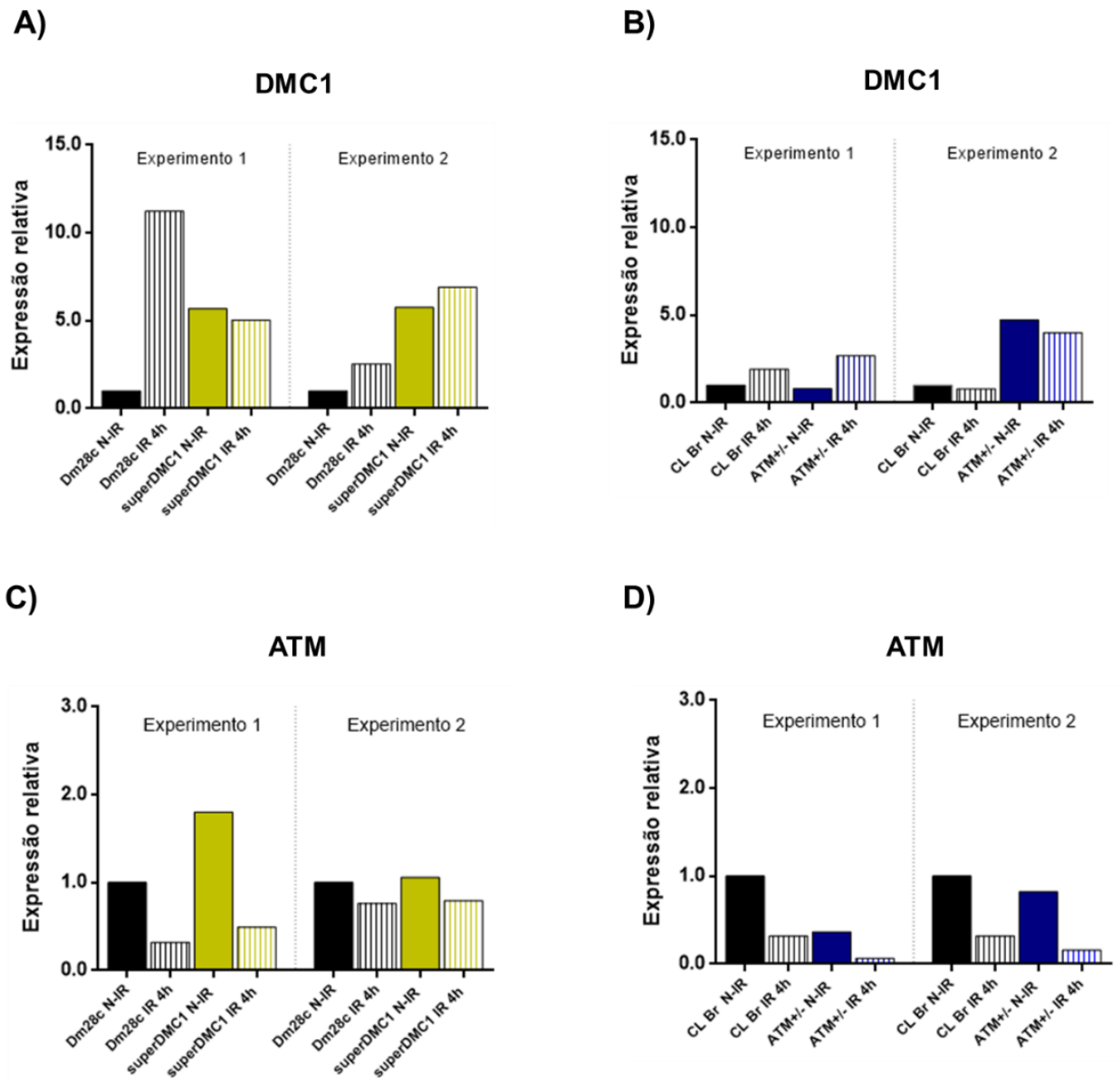


Figura 24 - Expressão dos transcritos envolvidos na recombinação homóloga em células de *Trypanosoma cruzi* irradiadas. Análise da expressão gênica de DMC1, RAD51 e ATM em células de parasitos selvagens e modificados superexpressores de DMC1 (A e C) e heminocautes para ATM (B e D). As células foram analisadas 4h após serem submetidas a radiação gama. Experimento realizado em duplicata biológica sem diferença estatística para ambas as células.

Como já se sabe que a radiação induz eventos de recombinação em células de eucariotos e levando em consideração o fato da recombinase de meiose ter sua expressão

aumentada após radiação, procurou-se saber se a superexpressão das recombinases DMC1 e RAD51, bem como a depleção de RAD51, poderiam influenciar eventos de recombinação, culminando na formação de híbridos em *T. cruzi*.

4.8. A Superexpressão de DMC1 aumenta os eventos de hibridização em *T. cruzi*

Após células de *T. cruzi* serem tratadas e incubadas separadamente com os corantes fluorescentes CFSE e YELLOW, elas foram misturadas e 24h depois fixadas em lâminas, onde foram analisadas por microscopia de fluorescência. Para este ensaio de formação de híbridos foram realizadas misturas entre células superexpressoras do gene de meiose DMC1, células superexpressoras e heminocautes para RAD51 e seus respectivos controles (células selvagens). Na tentativa de achar células híbridas marcadas em amarelo, como consequência de eventos de fusão citoplasmática, foram contadas 200 células por mistura a cada replicata biológica, sendo realizado no mínimo três experimentos por mistura.

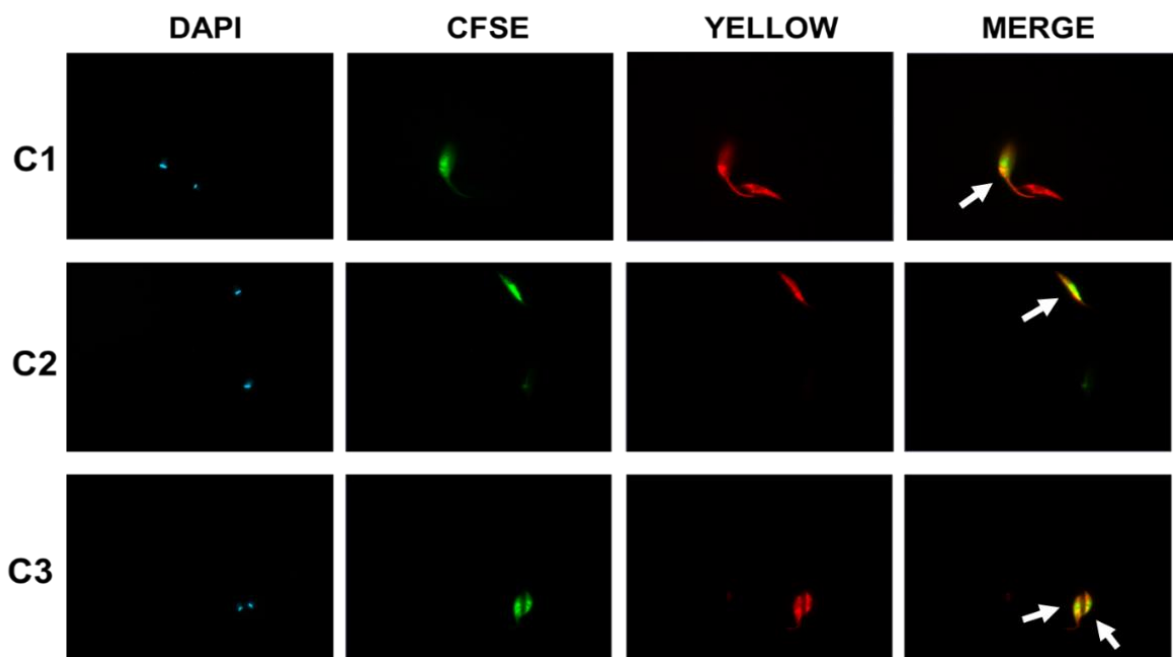
Na figura 25, tem-se imagens dos híbridos de *Trypanosoma cruzi* obtidas por microscopia de fluorescência, onde é possível visualizar as células marcadas em verde (CFSE), em vermelho (YELLOW) e as células híbridas amarelas duplamente marcadas (MERGE). A imagem apresenta células híbridas vistas em três campos diferentes (C1, C2 e C3) com DNA nuclear e mitocondrial marcados em azul (DAPI) (Figura 25A). Na tentativa de minimizar possíveis erros de classificação do que seriam células duplamente marcadas, quando necessário eram realizadas análises do eixo Z das imagens, sendo possível distinguir as células híbridas das não híbridas, como visualizado na figura 25B.

A figura 26 mostra o gráfico da porcentagem de células híbridas vistas em parasitos da cepa Dm28c, transformados e selvagens. É possível observar que a mistura entre células de *T. cruzi* que superexpressam o gene DMC1 (superDMC1 x superDMC1) apresentam uma porcentagem média de 15% de híbridos, aproximadamente quatro vezes maior que a porcentagem média de células híbridas encontradas para a mistura feita entre os parasitos WT (Dm28c x Dm28c), que foi de 3,7% do total de células contadas. De forma interessante, ao analisar a formação de híbridos entre as células WT e as transformadas para DMC1 (Dm28c x SuperDMC1), observou-se uma porcentagem ainda maior, com 18,59% de células amarelas, o que parece ser a consequência de um efeito aditivo na capacidade de fusão citoplasmática das células. As porcentagens de híbridos encontradas nessas misturas foram estatisticamente significativas quando comparadas às células selvagens Dm28c, concluindo-se assim que o fato das células de *Trypanosoma cruzi* superexpressarem o gene meiótico DMC1 no seu genoma, aumenta a capacidade de fusão celular do parasita. Evento este que

pode estar atrelado também a habilidade desses organismos em recombinar seu material genético.

Ao analisar as misturas entre as células superexpressoras de RAD51 em Dm28c (superRAD51 X superRAD51), foram observadas apenas 3 células amarelas nas quatro replicatas biológicas realizadas (total de 800 células contadas), o que corresponde a 0,03% de híbridos, sendo, portanto, considerada como uma célula não formadora de híbridos. As misturas de superRAD51 com células WT Dm28c também apresentaram porcentagens baixas, com uma média de 0,5% de híbridos. Contudo, ao analisar as misturas das células superRAD51 de *T. cruzi* com as células superDMC1, pôde-se observar um aumento na porcentagem dos híbridos, com uma média de 3,73%, bem semelhante a porcentagem encontrada no WT (Dm28c), porém ainda assim a formação de híbridos pela superDMC1 parece ficar prejudicada nessa mistura. O que sugere uma possível regulação dos genes envolvidos em processos de fusão pela recombinase RAD51, que por sua vez estaria limitando a capacidade do parasito superRAD51 em fundir citoplasma.

A)



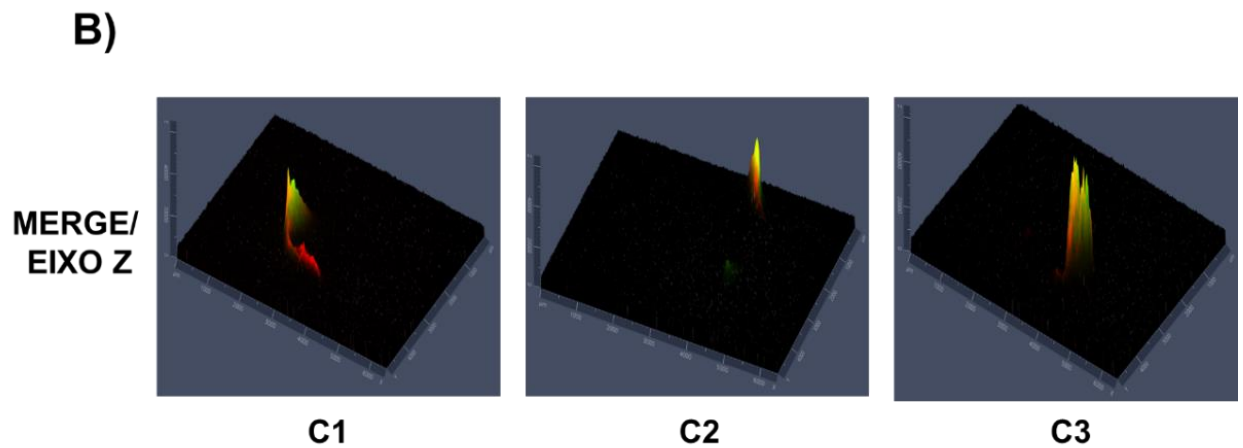


Figura 25 - Visualizações de células híbridas de *Trypanosoma cruzi*. **A:** Imagens representativas de células híbridas duplamente marcadas em amarelo apontadas por setas brancas. Fotos capturadas de três campos diferentes, C1 (campo 1), C2 (campo 2) e C3 (campo 3). DNA nuclear e mitocondrial corados com DAPI, células em verde coradas com CFSE, células em vermelho coradas com YELLOW e a sobreposição das imagens verde e vermelho em MERGE. **B:** Análise dos híbridos dos diferentes campos (C1, C2 e C3) no eixo tridimensional Z.

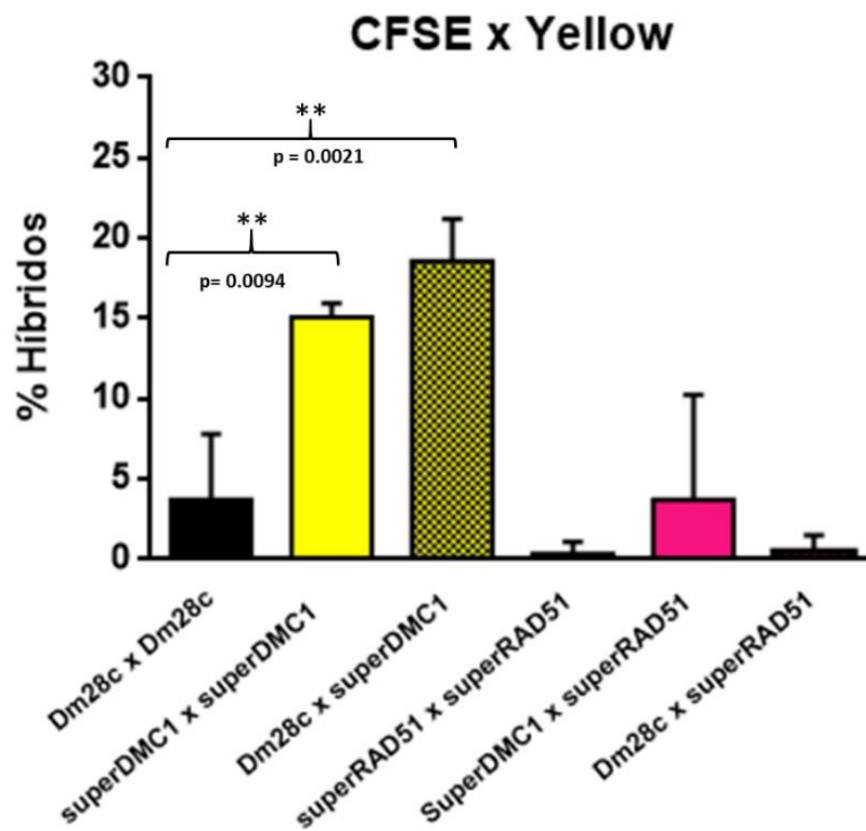
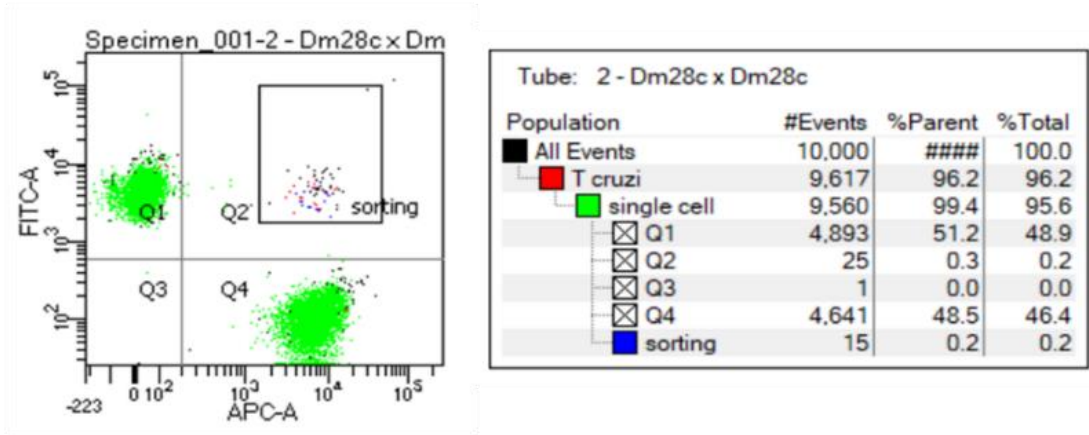


Figura 26 - Formação de híbridos em *T. cruzi* Dm28c modificados e selvagens. Porcentagens de híbridos encontrados em misturas das células de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c superexpressoras

das recombinases DMC1 e RAD51 e WT. Mistura entre as células selvagens (Dm28c x Dm28c); mistura entre as células superexpressoras do gene meiótico, DMC1 (superDMC1 x superDMC1); mistura entre as células superexpressoras da recombinase da HR, RAD51 (superRAD51 x superRAD51), mistura entre células modificadas para as diferentes recombinases (superDMC1 x superRAD51); misturas entre as células modificadas e o WT (Dm28c x superDMC1 e Dm28c x superRAD51), sendo (*) $p<0,05$ e (**) $p<0,01$.

Para fins de confirmação das células híbridas oriundas da mistura entre células superexpressoras de DMC1, foi realizada uma análise por citometria de fluxo em colaboração com o Instituto Carlos Chagas /FIOCRUZ-PR. Células amarelas, originárias de fusão celular entre superDMC1 foram identificadas e isoladas por “*sorting*” para análises futuras. Na figura abaixo, pode-se observar células identificadas na fluorescência referente ao verde, no quadrante Q1 (FITC), ao vermelho no quadrante Q4 (APC) e células marcadas nas duas fluorescências, no quadrante Q2 (*sorting*). Ao analisar a mistura entre as células Dm28c WT (Figura 27A) foi possível observar uma taxa de hibridização de 0,2% enquanto que para a mistura entre células superDMC1, foi observada uma taxa de hibridização de 33,7% (Figura 27B). O que confirma uma elevada formação de híbridos nas células superexpressoras do gene de meiose, DMC1, já observada anteriormente nos ensaios de microscopia de fluorescência. Os híbridos isolados de cada mistura foram mantidos em placas de cultura por aproximadamente 15 dias e avaliados visualmente quanto ao seu crescimento. Células híbridas oriundas da mistura superDMC1 x superDMC1 apresentaram um crescimento de 12%, já os híbridos da mistura Dm28c x Dm28c apresentaram um crescimento de 81%, sugerindo assim que células superexpressoras de DMC1, podem formar híbridos com maior instabilidade genômica que células selvagens.

A)



B)

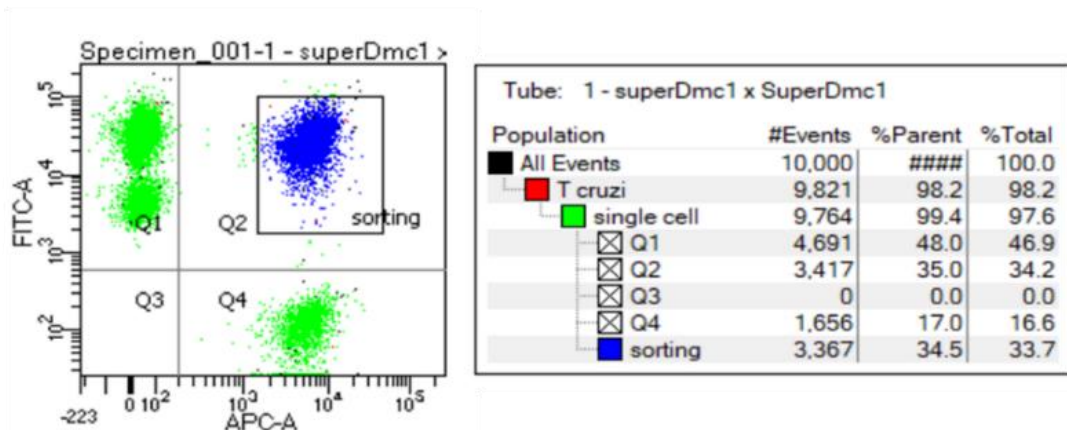


Figura 24- Análise de células híbridas por citometria de fluxo. Células de *T. cruzi* duplamente marcadas, isoladas por citometria de fluxo e destacadas nos quadrantes Q2 (sorting). A: Híbridos oriundos da mistura Dm28c x Dm28c, destacados em Q2. **B:** Células híbridas originárias da mistura superDMC1x superDMC1, em destaque no quadrante Q2 (em azul na figura). No total foram contados aproximadamente dez mil eventos para cada mistura realizada, com um valor de porcentagem de células híbridas de 33,7% para superDMC1 e 0,2% para WT Dm28c.

Como já visto em trabalhos anteriores com diferentes cepas de *T. cruzi*, a recombinação homóloga por meio de RAD51 parece ter um papel fundamental em processos de trocas genéticas na cepa híbrida CL Brener. A fim de avaliar processos de fusão nessa cepa selvagem e em células heminocautes e superexpressoras de RAD51, o ensaio de fusão citoplasmática foi realizado para diferentes misturas, como mostra a figura 28. Entretanto, todas as misturas realizadas com as células das cepa CL Brener neste trabalho, apresentaram baixos níveis de formação de híbridos. A mistura entre células selvagens CL Brener (CL x CL) apresentou uma média de híbridos de 0,12% (1 evento em 858 células), contrapondo os valores encontrados em trabalho anterior, onde a média nessa cepa variou de 2 a 5% de híbridos, enquanto que a mistura entre células heminocautes para RAD51 (Rad51+/- x Rad51+/-) apresentou uma média de 1,1% (9 eventos em 819 células). Também foram realizadas misturas entre as células superexpressoras de RAD51 construídas na cepa CL Brener (superRAD51 x superRAD51), onde não foi possível observar formação de híbridos.

Também foram realizadas misturas entre diferentes cepas (Dm x CL), para as quais não foi possível observar a formação de híbridos. Ao analisar a fusão citoplasmática entre células superexpressoras para RAD51 e DMC1 construídas em diferentes cepas (superDMC1 em Dm28c x superRAD51 em CL Brener), também não foi possível observar a formação de nenhuma célula amarela. Como na mistura de superDMC1 com superRAD51, ambas

construídas na cepa Dm28c, foi possível observar formação de híbridos (Figura 26) e na mistura de superDMC1 com superRAD51 construída em CL Brener, não foi possível observar nenhum híbrido (figura 28), acredita-se que a fusão citoplasmática em células de *T.cruzi* geneticamente modificadas para as proteínas da recombinação possa ser cepa dependente.

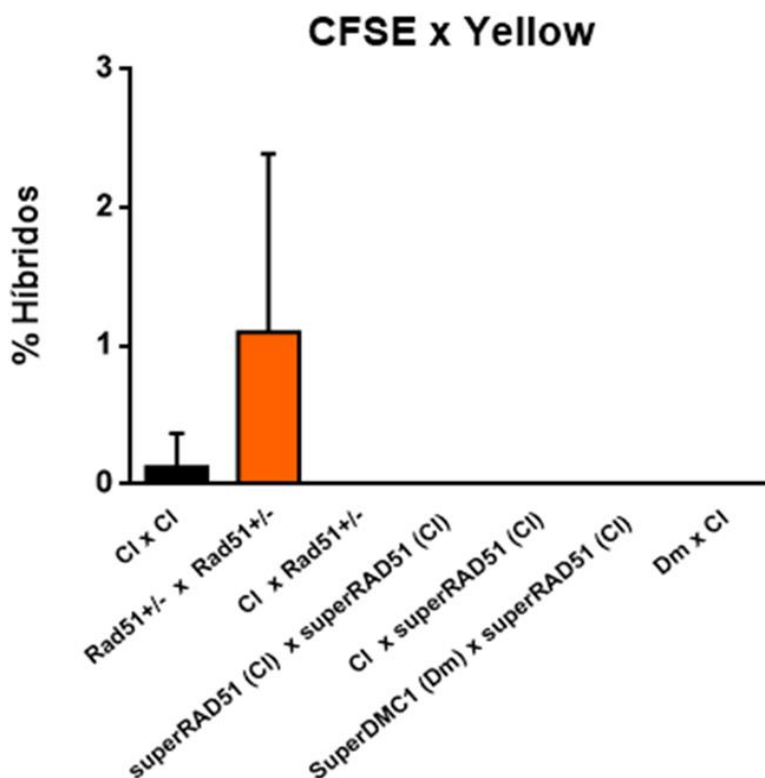


Figura 28- Formação de híbridos em *T. cruzi* CL Brener modificados e selvagens. Porcentagens de híbridos encontrados em misturas das células de *T.cruzi*, cepa CL Brener superexpressora e heminocaute para a recombinase RAD51 e WT. Mistura entre as células selvagens (Cl x Cl); mistura entre células heminocautes de RAD51 (Rad51 +/- x Rad51 +/-); mistura entre as células superexpressoras da recombinase da HR, RAD51 (superRAD51 x superRAD51); mistura entre células modificadas para RAD51 e o WT (Cl x Rad51 +/- e Cl x superRAD51); mistura entre células modificadas para as diferentes recombinases em diferentes cepas (superDMC1 em Dm28 x superRAD51 em Cl Brener); misturas entre diferentes cepas selvagens (Dm28c x Cl Brener).

4.8.1. Análise da cinética de formação de híbridos em células superDMC1 e superRAD51

Diante do insucesso na formação de híbridos com células da cepa CL Brener, decidiu-se então avaliar a cinética de formação de híbridos apenas em células construídas na cepa

Dm28c. Para isso foram realizados ensaios de fusão citoplasmática em células superexpressoras de DMC1 e RAD51, ambas em Dm28c. Com o intuito de observar possíveis eventos de fusão celular em diferentes tempos de mistura, foi realizada uma cinética com os tempos de 1h, 6h e 24h.

Como observado nas figuras 29A e 30A, as células superDMC1 já apresentam uma elevada porcentagem de hibridização com apenas 1 hora de mistura, com 18,12% de híbridos, número este que tende a se manter alto nos diferentes tempos analisados, apresentando uma média de 21,2% de híbridos para o tempo de 6 horas de mistura e mais uma vez uma porcentagem elevada para o tempo de 24h, com uma média de 18,3% de híbridos (Figura 30A). Esses resultados com misturas entre células superexpressoras de DMC1 mostra que o fato das células de *T.cruzi* superexpressarem o gene de meiose, por si só, já induz fusão citoplasmática, talvez por interferir na regulação de genes de fusão ou por gerar gametas que farão a fusão. De forma distinta, os valores médios de fusão nas células superRAD51 (Figura 29B e 30B) mantiveram-se baixos ao longo dos tempos analisados, com uma porcentagem de híbridos de 0,9% no tempo de 1h (6 eventos em 625 células), nenhuma célula amarela observada no tempo de 6h e apenas dois híbridos observados no tempo de 24h, o que corresponde a 0,3% (2 células em 628 analisadas). Estes resultados sugerem que a célula superexpressar a recombinase RAD51, não somente não influencia de forma positiva a capacidade de fusão do parasito, como também pode estar prejudicando essa capacidade, já que a porcentagem de híbridos em mistura com células WT Dm28c tende a ser maior (3,7%) do que em mistura com células transformadas superRAD51 Dm28c (0,03%). Os resultados de cinética de fusão citoplasmática encontrados aqui para as células superexpressoras da recombinase RAD51, corroboram os resultados anteriores com misturas de 24h (Figura 26), onde não foi possível observar formação de híbridos nestas células.

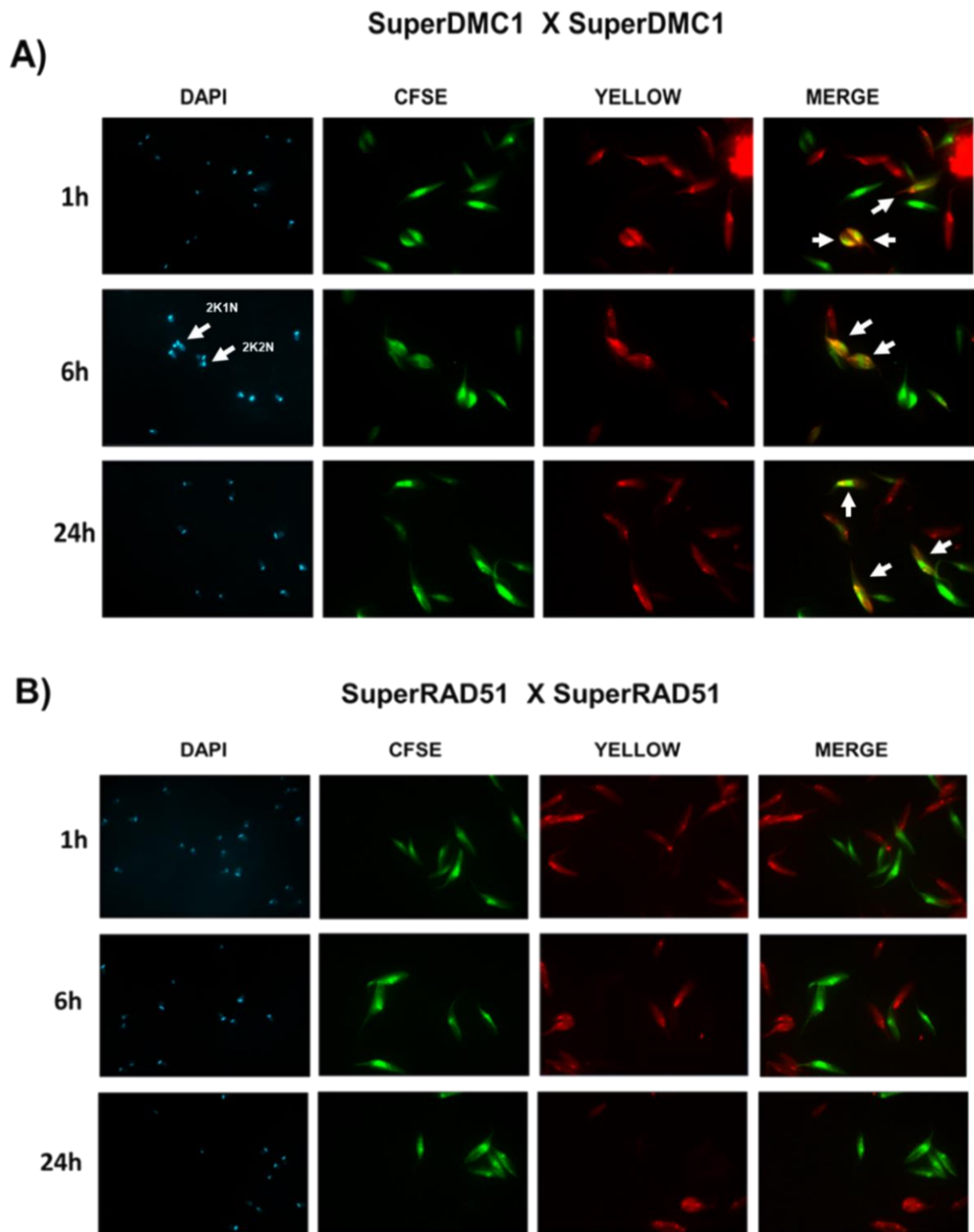


Figura 29 - Visualizações de células híbridas de *Trypanosoma cruzi* após diferentes tempos de mistura. Cinética de híbridos em células superexpressoras para DMC1 e RAD51. **A:** misturas entre células de *T. cruzi* superDMC1 fixadas e analisadas em diferentes tempos (1h, 6h e 24h), com células híbridas visualizadas em amarelo (MERGE) e apontadas por setas brancas. Híbridos com conteúdo de DNA 1K1N e 2K2N destacados por setas brancas no campo DAPI, onde o kDNA apresenta coloração

mais forte que o DNA nuclear. **B:** misturas entre células de *T. cruzi* superRAD51 fixadas e analisadas em diferentes tempos (1h, 6h e 24h), sem a presença de híbridos nas imagens sobrepostas (MERGE).

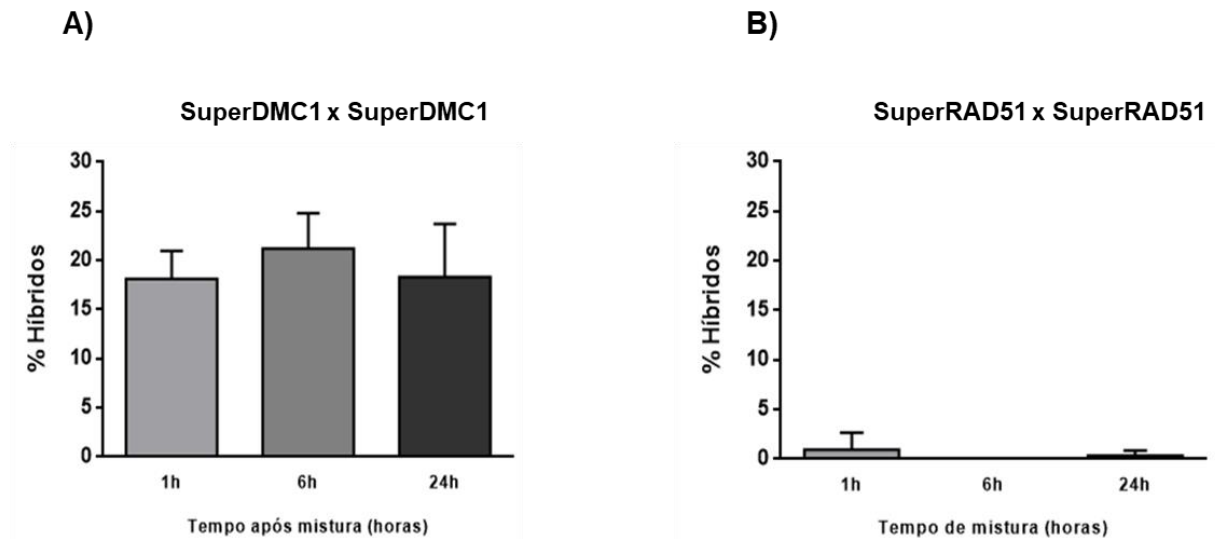


Figura 30 - Cinética de formação de híbridos em células de *Trypanosoma cruzi* modificadas. A: porcentagem média de híbridos em misturas com células superexpressoras de DMC1 (superDMC1 x superDMC1) analisadas em diferentes tempos (1h, 6h e 24h). **B:** porcentagem média de híbridos em misturas com células superexpressoras de RAD51 (superRAD51 x superRAD51) analisadas em diferentes tempos (1h, 6h e 24h). Experimentos realizados em triplicatas biológicas, sem diferença estatística.

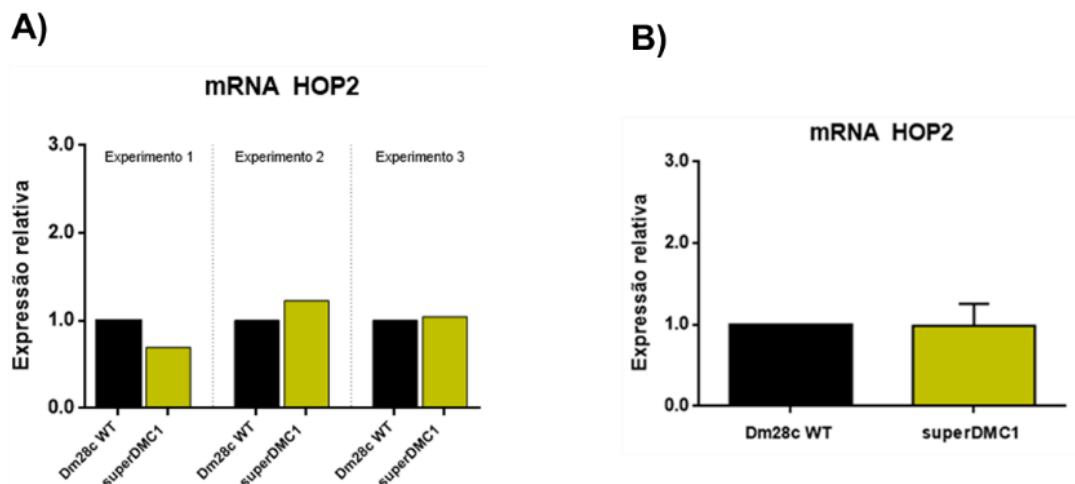
Na figura 29A, pode-se observar células híbridas encontradas nas misturas realizadas entre *T. cruzi* superDMC1 nos diferentes tempos analisados (1h, 6h e 24h), com parasitos marcados em verde (CFSE), vermelho (YELLOW) e duplamente marcadas (MERGE). Os DNAs do núcleo e da mitocôndria (kDNA) estão corados com DAPI em azul. Durante as análises foi possível visualizar células híbridas com a presença de um DNA nuclear e dois kDNAs (2K1N), típicos de quando o parasita está se dividindo, no entanto, para outras células, foi visto a presença de dois núcleos e dois kDNAs (2K2N), não sabendo se estas células seriam produtos imediatos de fusão ou produtos de divisão celular após fusão, como destacado para as células híbridas no tempo de 6h da figura 29A. No geral, os híbridos observados por microscopia de fluorescência neste trabalho, não apresentaram conteúdo de DNA nuclear e kDNA discrepantes visualmente, sendo a maioria 1K1N. A fim de comparação visual, na figura 29B, pode-se observar a cinética de mistura com as células superexpressoras de RAD51, não sendo visualizadas células híbridas nos campos destacados na imagem.

Diante dos resultados obtidos até aqui com os parasitos modificados para DMC1 e ATM, resolveu-se analisar a expressão dos transcritos primários HOP2 e MND1, envolvidos diretamente em eventos de recombinação meiótica.

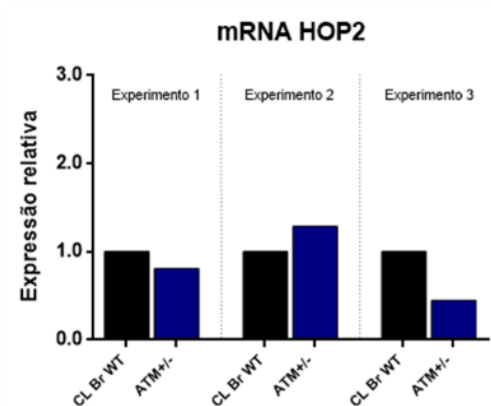
4.9. Expressão do gene de meiose HOP2 não é alterada nas células superDMC1 e ATM+/-, diferente da expressão de MND1

Por serem específicos de meiose e devido a sua interação com a recombinase DMC1, analisou-se a expressão dos transcritos HOP2 e MND1 em células superexpressoras de DMC1 e heminocautes para ATM. Como observado na figura abaixo, a superexpressão do gene de meiose DMC1 em células de *T. cruzi*, parece não interferir na expressão do transcrito HOP2 analisado (Figura 31A) sendo o valor de expressão relativa desse gene próximo ao valor do WT, sem diferença estatística (Figura 31B). O mesmo pode ser observado para as células deficientes na atividade cinase de ATM (Figura 31C), onde a expressão de HOP2 não foi estatisticamente diferente quando comparada às células selvagens (Figura 31D).

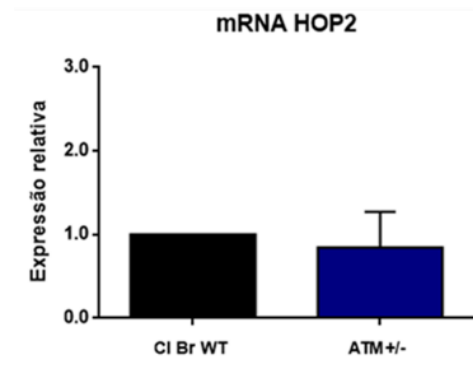
Já a expressão de MND1 mostrou um aumento nas células superDMC1 (Figura 31E), sem confirmação estatística (Figura 31F) e uma redução nas células ATM+/-, também sem diferença estatística (Figura 31H), sendo isto visualizado em duas das três replicatas experimentais realizadas com essas células (Figura 31G).



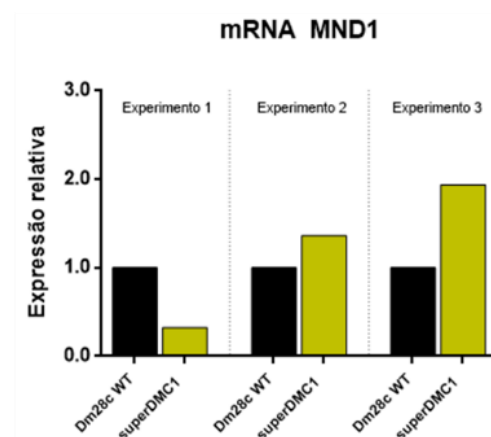
C)



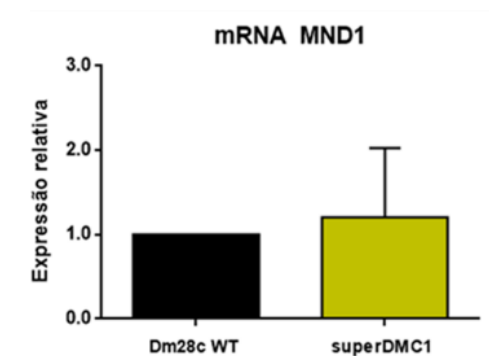
D)



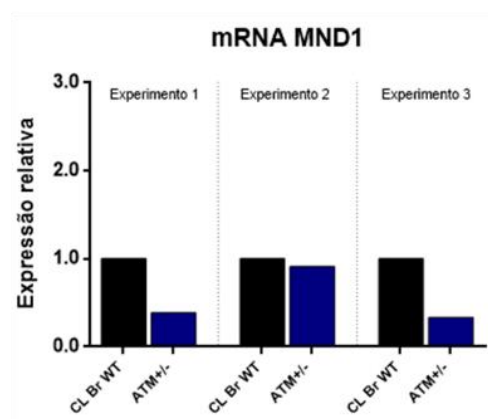
E)



F)



G)



H)

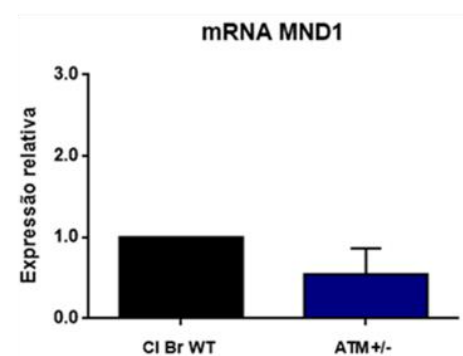


Figura 31 - Expressão dos transcritos de meiose HOP2 e MND1 em células de *Trypanosoma cruzi* modificadas. Análise da expressão gênica de HOP2 e MND1 em células superexpressoras do gene de meiose DMC1, superDMC1 e em células heminocautes para a atividade cinase de ATM,

ATM+/- . **A:** expressão de HOP2 nas triplicatas experimentais realizadas com as células superDMC1. **B:** média da expressão e HOP2 em superDMC1, sem diferença estatística. **C:** expressão de HOP2 nas triplicatas experimentais realizadas com as células ATM+/- . **D:** média da expressão de HOP2 em células heminocutes para ATM, sem diferença estatística. **E:** expressão de MND1 nas triplicatas experimentais realizadas com as células superDMC1. **F:** média da expressão de MND1 em superDMC1, sem diferença estatística. **G:** expressão de MND1 nas replicatas experimentais realizadas com as células ATM+/- . **H:** média da expressão de MND1 em ATM+/- , sem diferença estatística

4.10. Comparações estruturais entre as recombinases de *T. cruzi* e de humano revelam possíveis semelhanças de função

Com o propósito de melhor entender o papel das recombinases DMC1 e RAD51 de *Trypanosoma cruzi*, e a fim de associar os conhecimentos bioquímicos característicos destas proteínas com os dados experimentais obtidos com as células superDMC1 e superRAD51, foram realizadas análises *in silico* utilizando a ferramenta de bioinformática de modelagem comparativa. Para isso as recombinases de humano foram utilizadas como modelos de referência, já que possuem estruturas resolvidas, apresentam identidade de sequência com *T. cruzi* acima de 50% para ambas e já são bem discutidas na literatura.

Primeiro, foi realizado um alinhamento entre a sequência proteica de DMC1 de *T. cruzi* (TcDMC1) e DMC1 de humano (HsDMC1). Alinhamento este que foi utilizado como entrada no servidor MAFFT-DASH¹⁵, que faz um alinhamento múltiplo com as sequências homólogas depositadas no PDB. Como resultado, o programa retornou cinco estruturas disponíveis. O alinhamento entre as sequências foi colorido pelo servidor SMS¹⁶, com base nas propriedades bioquímicas dos aminoácidos como polaridade da cadeia lateral e a presença de grupamentos químicos distintos. Dentre as estruturas com homologia de sequência com TcDMC1 e HsDMC1, estão modelos referentes a filamentos helicoidais de RAD51 de humano (5JZC_A) e levedura (1SZP_A), octâmeros de DMC1 de humano (1V5W_A e 4HYY_A) e o domínio ATPase de HsDMC1 (6R3P_A). Os modelos escolhidos e utilizados como referência neste trabalho estão destacados em vermelho na legenda e apontados por setas no alinhamento (Figura 32).

¹⁵ <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> . (ROZEWICKI et al., 2019)

¹⁶ https://www.bioinformatics.org/sms2/color_align_prop.html

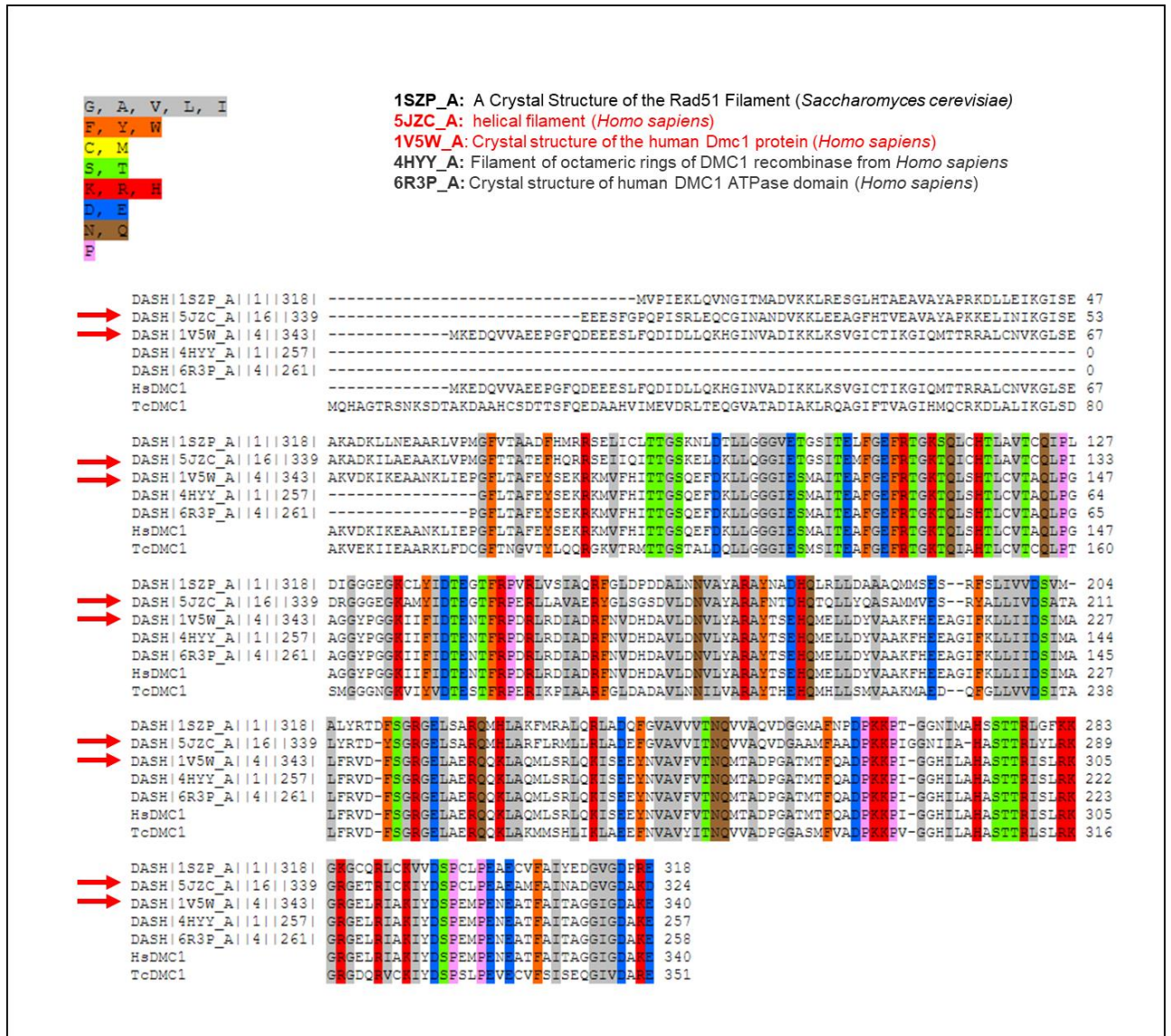


Figura 32 - Alinhamento da estrutura primária de proteínas homólogas a DMC1. Alinhamento de sequências de aminoácidos entre diferentes modelos do PDB homólogos a TcDMC1 e HsDMC1. Os resíduos de aminoácidos estão coloridos com base em suas propriedades bioquímicas; em cinza (cadeia lateral apolar), laranja (cadeia lateral aromática), amarelo (enxofre na cadeia lateral), verde (OH na cadeia lateral), vermelho (carga positiva), azul (carga negativa), marrom (NH₂ na cadeia lateral) e rosa (apolar cíclico). Modelo 1SZP referente a filamentos de Rad51 de levedura, 5JZC referente a filamentos helicoidais de Rad51 de humanos, 1V5W e 4HYY referentes a octâmeros de DMC1 de humano, 6R3P referente ao domínio ATPase de DMC1 de humanos, HsDMC1 (sequência da proteína DMC1 de humano retirada do NCBI¹⁷) e TcDMC1 (sequência da proteína DMC1 de *T. cruzi* retirada do TritypDB¹⁸). Os modelos destacados em vermelho 5JZC_A e 1V5W_A e indicados por setas foram os modelos escolhidos e utilizados neste trabalho.

¹⁷ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CAG30372.1>

¹⁸ <https://tritypdb.org/tritypdb/app/record/gene/TcCLB.506885.310>

As cadeias “A” das estruturas 1V5W e 5JZC relativas as recombinases humanas foram utilizadas como modelos de referência para a construção tridimensional das proteínas TcDMC1 e TcRAD51, respectivamente. Para um melhor entendimento, daqui em diante denominou-se o modelo 1V5W como HsDMC1 e o modelo 5JZC como HsRAD51. Com base no alinhamento entre as sequências das recombinases de humano e de *T. cruzi* (realizado no Clustal Omega¹⁹ e no Blastp²⁰) pode-se observar uma identidade de sequência de 59,88% para DMC1 (Figura 33A) e de 73% para RAD51 (Figura 33B).

A) DMC1

		59,88%
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
HsDMC1	-----GSHMKEDQVVAEPEGFQDEEESLFQDIDLLQKHGINVADIKKLKSVGICT	50
TcDMC1	MQHAGTRSNKSDAKAAHCSDTTSFQEDAAHVIMEVDRLTEQGVATADIAKLQAGIFT	60
	.. *: :: .**:: :: :* *::: .*** **:.*** *	
HsDMC1	IKGIQMTTRRALCNVGLSEAKVDKIKEAANKLIEPGFLTAFEYSEKRKMVFHITTGSQE	110
TcDMC1	VAGIHMQCRKDLALIKGLSDAKVEKIEAARKLFCGFTNGVTYLQQRGKVTRMTTGSTA	120
	: **: * *: . :****:****:*** **.: * ... * :*: * :****	
HsDMC1	FDKLLGGGIESMAITEAFGEFRTGKTQLSHTLCVTAQLPGAGGYPGGKIIFIDENTFRP	170
TcDMC1	LDQLLGGGIESMSITEAFGEFRTGKTQIAHTLCVTCQLPTSMGGGNGKVIYVDTESTFRP	180
	:*:*****:*****:*****:*** : * .***:****:****	
HsDMC1	DRLRDIADRFNVDHDAVLNVLVARAYTSEHQMELLDYVAAKFHEEAGIFKLLIIDSIMA	230
TcDMC1	ERIKPIAARFGLDADAVLNILVARAYTHEQMHLLSMVAAKMAED--QFGLLVDSITA	238
	:*: * * *: . * ****: * * **** ***: ** . ****: * : * *:**** *	
HsDMC1	LFRVDFSGRGELAERQQKLAQMLSRQKISEEYNVAVFVTNQMTADPGATMTFQADPKKP	290
TcDMC1	LFRVDFSGRGELAERQQKLAKMMSHLIKLAEEFNNAVYITNQVVADPGGASMFVADPKKP	298
	*****:*****:***: * :*:*****:****:****: * *****	
HsDMC1	IGGHILAHASTTRISLRKGRGELRIAKIYDSPENPEATFAITAGGIGDAKE	343
TcDMC1	VGGHILAHASTTRLRLKGRGDQRVCKIYDSPSLPEVECVFSISEQGIVDARE	351
	:*****:*****: * .*****: ** * .*: : * * *: *	

¹⁹ <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

²⁰

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

B) RAD51

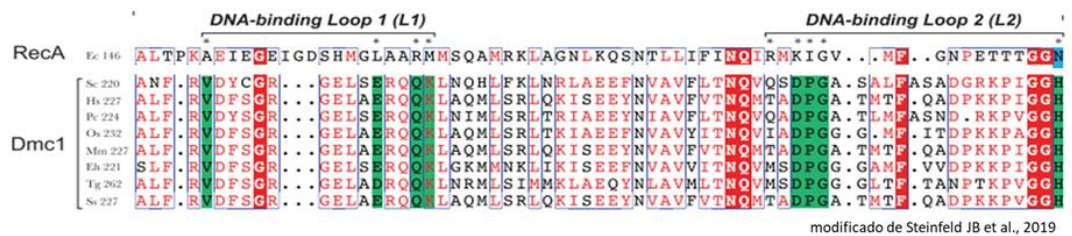
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		73%
HsRAD51	-----MAMQ-MQLEANADTSVEEESFGPQPISRLE	29
TcRAD51	MNTRSKRGKRKGVEEVHEIANTSPDPVAAPEQQQQQEDQONVDGANNGGFRVIQVLE	60
	* * : : : . : . * : * , **	
HsRAD51	QCGINANDVKKLEEAGFHTVEAVAYAPKKELINIKGISEAKADKILAEAAKLVPMGFTTA	89
TcRAD51	SYGIASADIKKLMESGFYTVESVAYAPKKNILAVKGISETKADKIMAECAKLVPMGFTSA	120
	. * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HsRAD51	TEFHQRRSEIIQITTGSKELDKLLQGGIETGSITEMFGEFRTGKTQICHTLAVTCQLPID	149
TcRAD51	VVYHEARKEIIMVTGSRVDKLLGGGIETGGITELFGEFRTGKTQLCHTLVTCQLPIS	180
	. * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HsRAD51	RGGGEGKAMYIDTEGTFRPERLLAVAERYGLSGDVLNVAARAFNTDHQTLQYQASA	209
TcRAD51	QGGAEGLMALYIDTEGTFRPERLVAVAERYKLDQDVLNVAARAFNTDHQQLLQASA	240
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HsRAD51	MMVESRYALLIVDSATALYRTDYSGRGELSARQMHLARFLRMLRLADEFGVAVVITNQV	269
TcRAD51	MMAENRFALLIVDSATALYRTDYSGRNELAARQMHGKFLRSLHNLAEYGVAVVITNQV	300
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HsRAD51	VAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHASTTRLRLKGRGETRICKIYDSPCLPEAEAMFA	328
TcRAD51	VANVDGSAQMFQADAKKPIGGHIIAHASTTRLRLKGRGEQRIMKVYDSPCLAEAEIIFG	360
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HsRAD51	INADGVGDAKD	339
TcRAD51	IYEDGVGDARD	371
	* * : * : * : *	

Figura 33 - Alinhamento de estrutura primária das proteínas entre HsDMC1 e TcDMC1. A: Alinhamento das sequências de aminoácidos entre a recombinase meiótica de humano (HsDMC1: 1V5W, 343 aminoácidos) e a de *Trypanosoma cruzi* (TcDMC1, 351 aminoácidos) com 59,88% de identidade entre elas. **B:** Alinhamento das sequências de aminoácidos entre a recombinase da via HR de humano (HsRAD51: 5JZC, 339 aminoácidos) e a de *Trypanosoma cruzi* (TcRAD51, 371 aminoácidos) com 73% de identidade. * representa aminoácidos idênticos.

Na parte superior da figura 34A, tem-se uma representação esquemática retirada de Steinfeld e colaboradores (2019) mostrando o alinhamento da estrutura primária das regiões de Loop1 e Loop2 de DMC1 em diferentes organismos e logo abaixo pode-se ver que as regiões L1 e L2 de TcDMC1 (sublinhadas e destacas em amarelo) apresentam os mesmos 8 resíduos conservados nas outras espécies. Sendo 4 resíduos na região de Loop1: V (valina), E (ácido glutâmico), Q (glutamina) e K (lisina) e 4 resíduos na região de Loop2: D (ácido aspártico), P (prolina), G (glicina) e H (histidina), todos destacados em verde (parte inferior da Figura 34A).

A conservação de resíduos em regiões de ligação ao DNA em TcRAD51 também foi observada. Na figura 34B, tem-se os aminoácidos conservados entre as diferentes espécies (modificado de Steinfeld et al 2019) e logo abaixo a sequência de TcRAD51 com os 9 resíduos característicos da recombinase RAD51, destacados em azul (parte inferior da Figura 34B). Os 4 resíduos conservados na região de L1 :T (treonina), A (alanina), M (metionina) e H (histidina) e os 5 resíduos da região L2: V (valina), N (asparagina), V (valina), D (ácido aspártico) e H (histidina).

A) DMC1

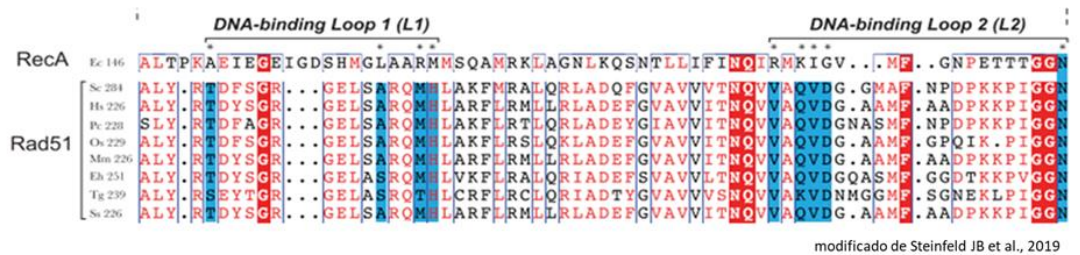


DMC1 (*T. cruzi* Cl Brener Esmeraldo-Like)

MQHAGTRSNKSDAKDAHAHCSDTTSFQEDAAHVIMEVDRLTEQGVATADIAKLQAGIFTVAGIHMQCRKDLALIKGLSDAKVEKIIIEAARKLDCGFTNGVTYLQQRGKVTMTTGSTALDQLGGGIESMSITE
AFGEFRTGKTQIAHTLCVTCQLPTSMGGNGKVIYVDTESTFRPERIKPIAARFLDADAVLNILVARAYTHEQMHLMSVAAKMAEDQGLLVDSITALFRVDFSGRGELAEARQGLAKMMSHLIKLAEEFN
VAVYITNQVYADPGGASMFVADPKKPVGGHILAHASTTRLRLKRGDGRVQKIYDPSLPEVECFVISEQGVDADE (L1)

(L2)

B) RAD51



RAD51 (*T. cruzi* Cl Brener Esmeraldo-Like)

MNTRSRGKRKGVVEVHEIANTSPDPVAAPEQQQQEDQNVGDANNGGFRVQIVLESYGASADIKKLMESGFYTVESVAYAPKKNILAVKGISETKADKIMAECAKLVPMGFTSAVVYHEARKEIMVTT
GSREVDKLLGGGIETGGITELFGEFRTGKTQLCHTLCTCQLPISQGAEGMALYIDTEGTFRPERLVAVARYLDPQDVLNSVACARAFNTDQQQLLQASAMMAENRFJIIIVDSATALYRDYSGRNLAEARQ
MH LGKFLRLHNLAEYGVAVVVTNQVAVNDGSAQMFQADAKKPIGGHILAHASTTRLRLKRGGRQIRMKVYDPSCLAEAEAFGIYEDGVGDARD (L1)

(L2)

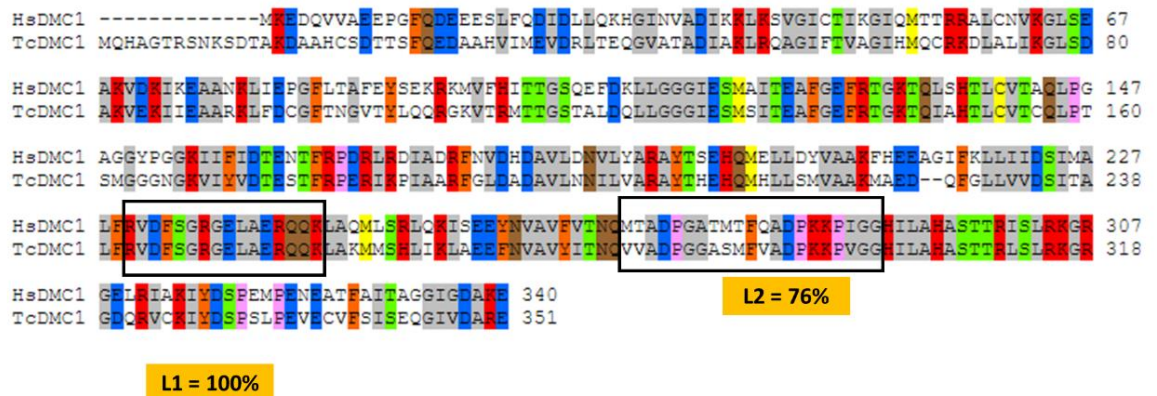
Figura 34 - Análise de sequência das regiões L1 e L2 das recombinases DMC1 e RAD51.

Identificação dos resíduos de aminoácidos específicos de cada recombinase nas sequências proteicas de *T. cruzi*. **A:** esquema de alinhamento das regiões de Loop 1 e 2 para RecA (*Escherichia coli*) e DMC1 entre diferentes espécies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Pneumocystis carinii*, *Oryza sativa*, *Mus musculus*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* e *Sus scrofa*), retirado de Steinfeld et al 2019 (parte superior). Identificação de resíduos característicos de DMC1 nas regiões L1 e L2 de TcDMC1, destacados em verde (parte inferior). **B:** esquema de alinhamento das regiões de Loop 1 e 2 para RecA e RAD51 entre diferentes espécies, retirado de Steinfeld et al 2019 (parte superior). Identificação de resíduos característicos de RAD51 nas regiões L1 e L2 de TcRAD51, destacados em azul (parte inferior).

Como, neste trabalho foram utilizados os modelos de humano na construção das estruturas tridimensionais de *T. cruzi*, decidiu-se então comparar as regiões L1 e L2 dessas proteínas baseadas nas propriedades bioquímicas dos resíduos de aminoácidos. Sendo assim, ao comparar apenas as regiões de loop das recombinases de *T. cruzi* com as recombinases de humano, é possível ver que as regiões apresentam estrutura primária para TcDMC1 com 100% identidade na região L1 e 76% na região L2 (Figura 35A). O mesmo padrão de conservação de identidade de sequência foi observado em TcRAD51, com identidade de 86% na região L1 e 72% na região L2 (Figura 35B). Esses valores de identidade elevados nas regiões de ligação ao DNA, demonstra uma provável conservação estrutural dessas regiões entre as recombinases de *T. cruzi* e de humano.

A presença dos resíduos de aminoácidos específicos para cada proteína e essa conservação dentro das regiões de ligação ao DNA, sugere que as recombinases DMC1 e RAD51 de *Trypanosoma cruzi* talvez possam estar desempenhando as mesmas funções que as recombinases de humano e de outros organismos. Como DMC1 é específica de meiose e possui resíduos de aminoácidos próprios e conservados em organismos que sabidamente se reproduzem de forma sexuada meiótica, acredita-se que, assim como em *Trypanosoma brucei*, TcDMC1 pode também exercer um papel ativo em situações específicas que ainda não foram observadas em *T. cruzi*, como por exemplo estar atuando em processos de recombinação meiótica.

A) DMC1



B) RAD51

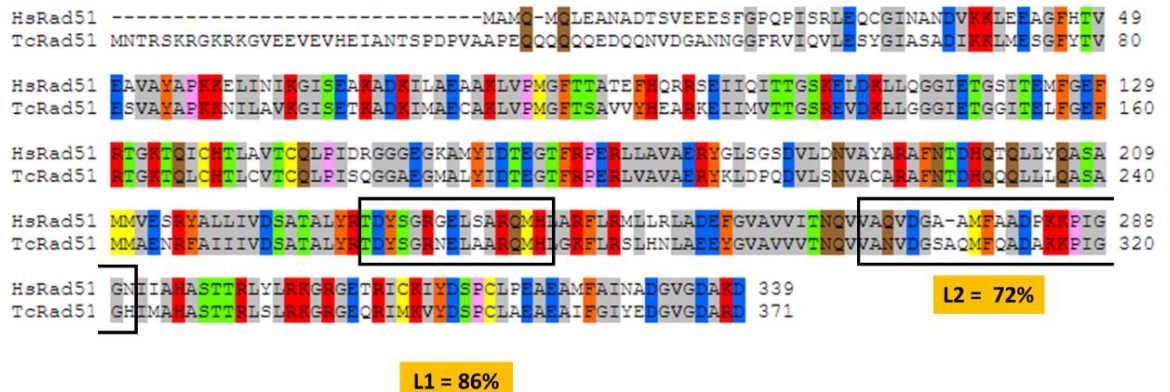


Figura 35 - Comparação da identidade de sequência das regiões L1 e L2 das recombinases DMC1 e RAD51 de humano e de *T. cruzi*. **A:** Alinhamento entre as sequências de HsDMC1 e TcDMC1 com destaque para as regiões de loop 1 e 2 (regiões dentro dos retângulos), L1: 100% de aminoácidos idênticos; L2: 76% de identidade. **B:** Alinhamento entre as sequências de HsRAD51 e TcRAD51 com destaque para as regiões de loop 1 e 2 (regiões dentro dos retângulos), L1: 86% de identidade; L2: 72% de identidade. HsDMC1 e HsRAD51 nesta figura referem-se a sequências proteicas das recombinases de humano retirada do *NCBI*.

4.10.1. TcDMC1 e sua semelhança estrutural com a proteína meiótica humana

A princípio foram gerados cinco mil modelos de TcDMC1, dentre os quais os dez de menor valor de DOPE score foram selecionados e analisados no CHIMERA (*UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, supported in part by the National Institutes of Health*). Ao fazer um alinhamento tridimensional, observou-se que aproximadamente 90 resíduos iniciais da região N-terminal dos modelos de TcDMC1 gerados não estavam se

sobrepondo com o modelo de referência 1V5W, formando uma região desordenada e sem estrutura definida. Na tentativa de melhorar a modelagem de TcDMC1, foi retirado os primeiros 93 resíduos da sequência proteica de DMC1 de *T. cruzi* e então foi realizada uma nova modelagem sendo gerados dessa vez dez mil modelos.

Após análises dos dez modelos de menor valor de DOPE, partiu-se para o refinamento energético do melhor modelo, o qual teve a sua energia minimizada até chegar no modelo monomérico final (Figura 36). Logo após a obtenção do modelo, a validação estatística foi realizada na plataforma SAVESv6.0 com base no valor de ERRAT, que mede as possíveis interações inter-residuais da estrutura e também com base no gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK, que analisa as qualidades estereoquímicas das estruturas proteicas, como os ângulos ϕ ²¹ e ψ ²².

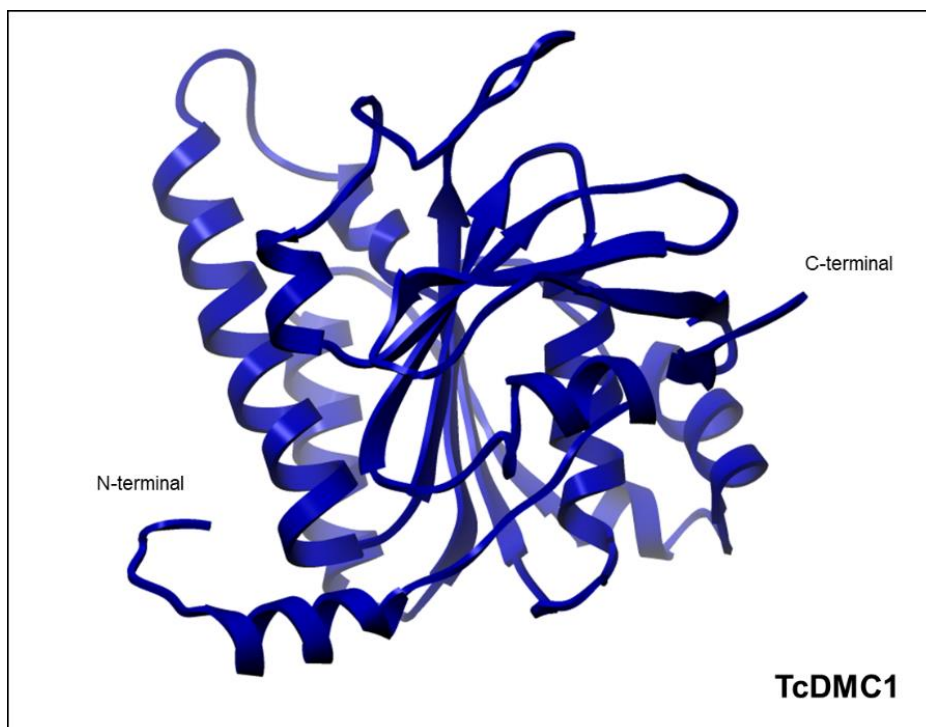


Figura 36 - Modelo tridimensional do monômero TcDMC1. Estrutura terciária da proteína DMC1 de *Trypanosoma cruzi* gerada por modelagem comparativa.

Como resultado de análise dos ângulos diedros representados no gráfico de Ramachandran (Figura 37), foi possível observar que o modelo teórico TcDMC1 apresenta 195 resíduos em regiões mais favoráveis (87,1%), 26 resíduos em regiões adicionais

²¹ ângulo de torção entre o nitrogênio do grupo amina e o carbono alfa.

²² ângulo de torção entre o carbono alfa e o carbono do grupo carbonil.

permitidas (11,6%), 3 resíduos em regiões permitidas generosamente (1,3%) e nenhum resíduo em regiões desfavoráveis. Dentre os resíduos encontrados em regiões permitidas generosamente, 2 estão na região de loop (L2) ou próximo a ela e o outro está no início da estrutura terciária, tendo, portanto, maior grau de liberdade devido a um menor número de interações atômicas com os resíduos vizinhos. Ao analisar o gráfico ERRAT, apenas os resíduos encontrados na região de Loop1 (L1) ultrapassam valores de erro acima de 99%, destacados em vermelho (Figura 38). Quando verificada a estrutura terciária nesse local observou-se uma região de “turn” com resíduos seguidos de glicina (Gly153 e Gly155), o que também pode implicar em flexibilidade conformacional da estrutura. No entanto, o valor médio da qualidade geral do modelo ficou em 90,377, o que significa dizer que mais de 90% da proteína apresenta valor de qualidade abaixo dos valores de erro, sendo assim o modelo teórico TcDMC1 considerado um modelo confiável, segundo os parâmetros analisados pelo programa.

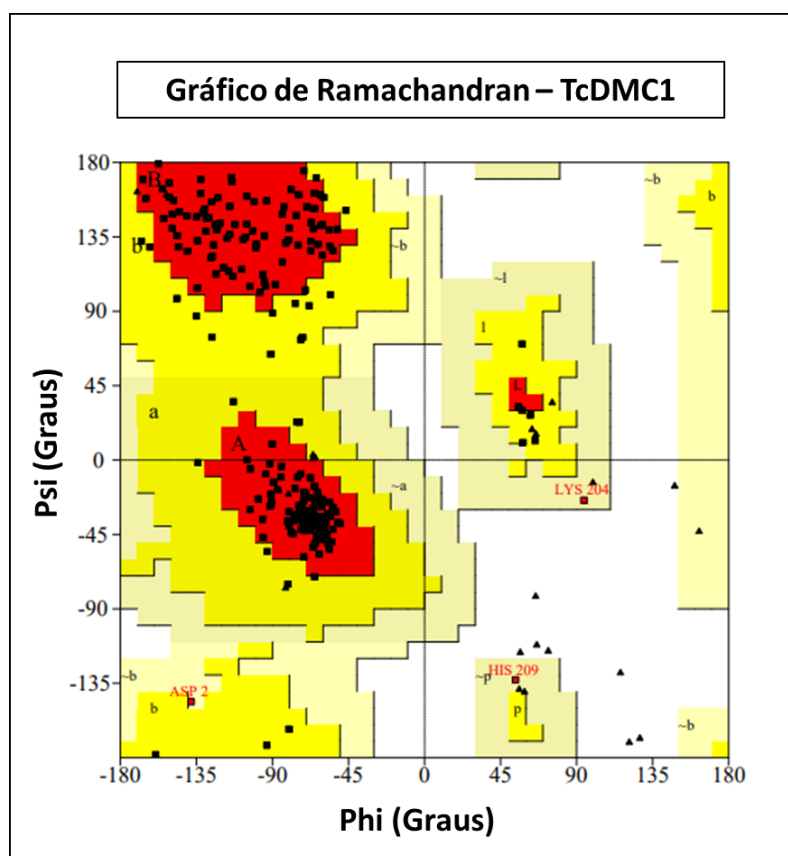


Figura 37 - Análise dos ângulos *Phi* e *Psi* do modelo teórico de TcDMC1. Gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK. Em vermelho está representado as regiões mais favorecidas, em amarelo as regiões adicionais permitidas, em bege as regiões permitidas generosamente e em branco

as regiões desfavoráveis. A numeração dos resíduos está normalizada, sendo o Asp2 referente ao Asp95, a Lys204 referente a Lys297 e a His209 referente a His302 na estrutura primária de TcDMC1.

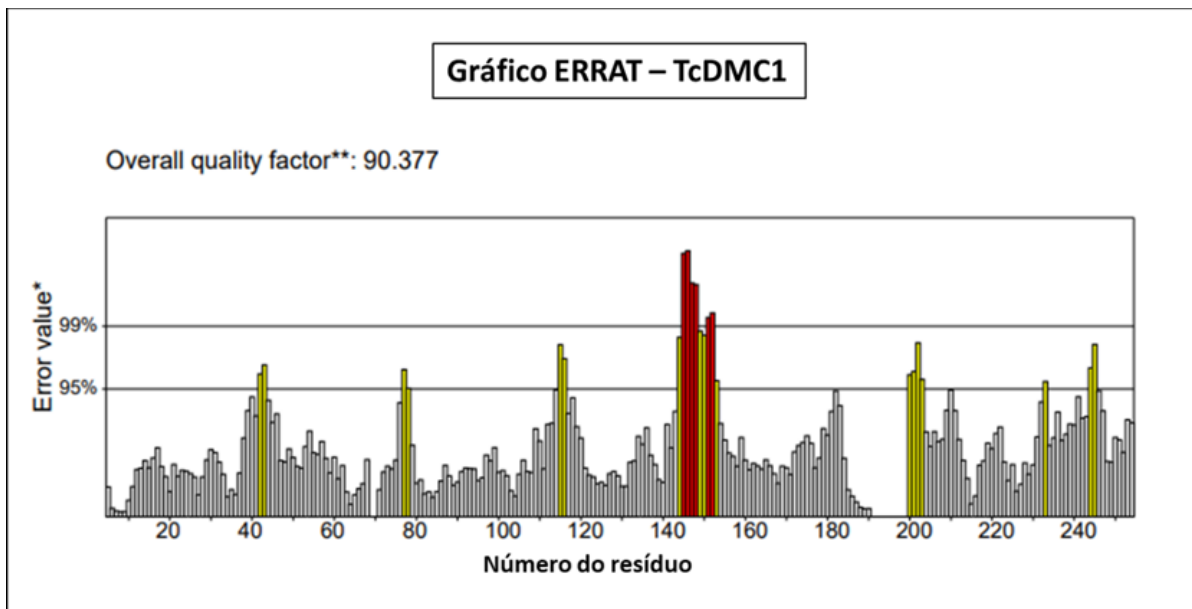


Figura 38 - Análise das interações inter-residuais do modelo teórico de TcDMC1. Gráfico de análises das interações inter-residuais gerado pelo programa ERRAT. As duas linhas representadas no eixo do erro (95% e 99%) retratam o grau de confiança de rejeição de determinadas regiões. Em branco estão representados os resíduos que ficaram abaixo dos valores de erro, em amarelos estão os resíduos que ficaram acima do erro de 95% e abaixo de 99% e os resíduos destacados em vermelho ficaram com valores de erro acima de 99%. *Overall quality factor* refere-se ao fator de qualidade geral médio da proteína (TcDMC1: 90.377). A numeração dos resíduos foi normalizada, sendo que o resíduo 1 é referente ao resíduo 94 da estrutura primária de TcDMC1.

Após a validação estatística e confirmação da qualidade do modelo TcDMC1, partiu-se então para as comparações com o modelo de HsDMC1. Inicialmente foi realizado um alinhamento estrutural entre os modelos TcDMC1 e HsDMC1 (1V5W), onde foi possível observar a conservação de estruturas secundárias e das regiões de loop entre as recombinases de humano e de *Trypanosoma cruzi*.

O modelo PDB ID:1V5W utilizado como molde neste trabalho apresenta um *gap* na região de Loop 2 (região não resolvida por cristalografia), o que fez com que o *Modeller* utilizasse uma abordagem *ab initio* e de cálculos de energia a partir de campos de força para

adição dos resíduos durante a construção do modelo. Sendo assim, a L2 modelada como uma região sem estrutura secundária definida em TcDMC1.

A figura 39 mostra as comparações estruturais entre o modelo teórico de DMC1 gerado para o parasita (Figura 39A) e o modelo 1V5W (Figura 39B). Na figura 39C, observa-se a sobreposição das duas estruturas terciárias com um valor de RMSD²³ de 0.573 Å. Com este valor de RMSD pode-se inferir que o modelo TcDMC1 gerado por modelagem comparativa se assemelha ao modelo HsDMC1. Fato este que se confirma ao analisar as estruturas secundárias de alfa hélice e folhas beta das proteínas, em destaque na figura abaixo, onde pode-se observar 9 alfas hélices para TcDMC1 e 8 alfas hélices para HsDMC1 (Figura 39D) nas mesmas posições, com exceção da $\alpha 9$ que está presente apenas em TcDMC1. Foi observado também 9 folhas betas em TcDMC1 e 9 folhas betas em HsDMC1 (Figura 39E) exatamente nas mesmas posições.

²³ *Root Mean Square Deviation*: Desvio quadrático médio. Medida de similaridade ou distância entre moléculas.

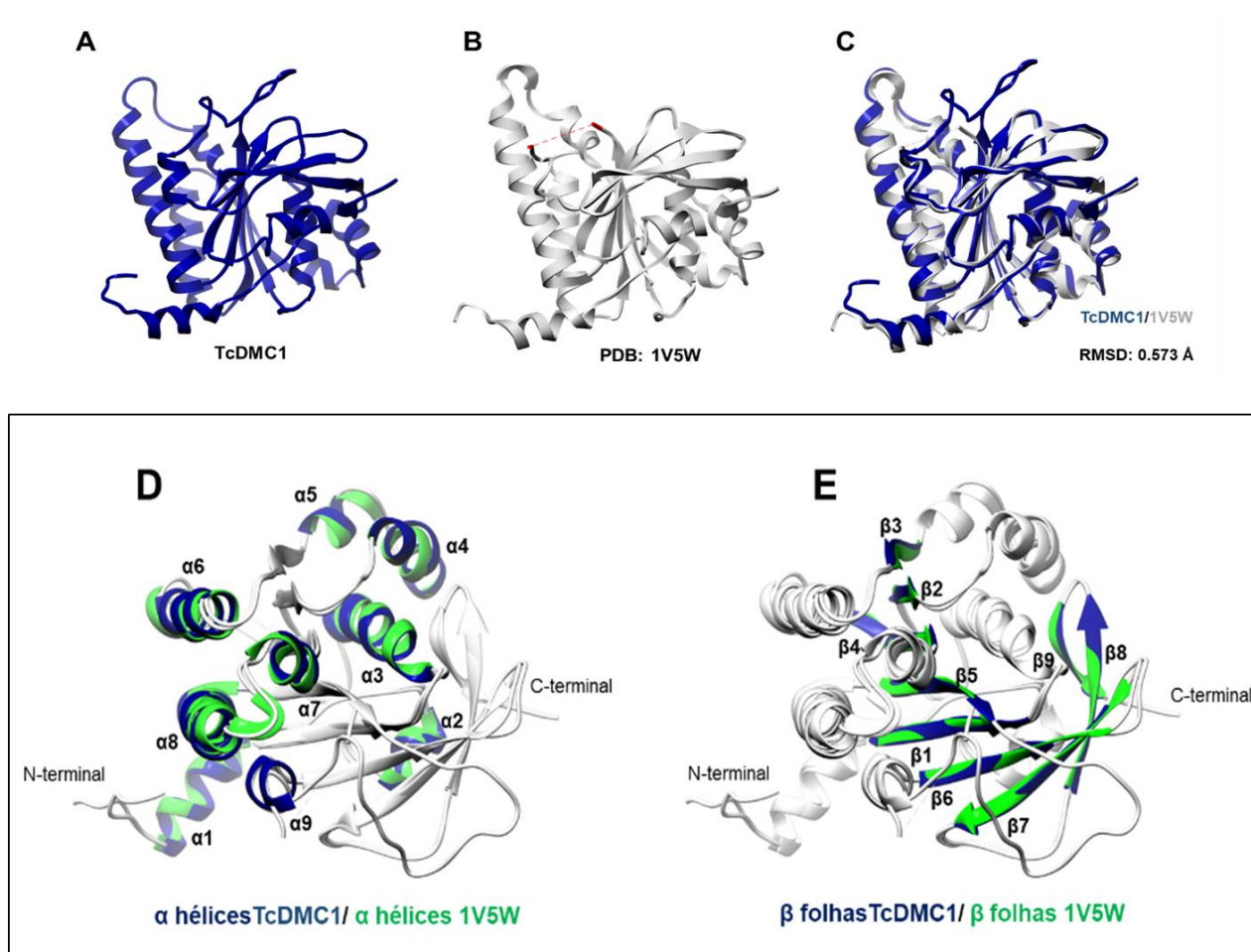


Figura 39 - Comparação entre o modelo tridimensional da recombinase meiótica DMC1 de *Trypanosoma cruzi* e DMC1 de humano, com destaque para as estruturas secundárias de alfa hélice e folha beta. **A:** estrutura monomérica de TcDMC1. **B:** modelo de HsDMC1 retirado do PDB (1V5W). **C:** sobreposição estrutural de TcDMC1 (em azul escuro) e HsDMC1 (cinza), com RMSD de 0.573 Å. **D:** sobreposição estrutural das regiões de alfa hélice de TcDMC1 (em azul escuro) e HsDMC1 (em verde claro). **E:** sobreposição estrutural das regiões de folha beta de TcDMC1 (em azul escuro) e HsDMC1 (em verde claro).

Ao verificar o modelo tridimensional das regiões de loop de TcDMC1 e HsDMC1, também foi identificada uma conservação de estrutura secundária na região L1, como visualizada na figura 40, o que corrobora os 100% de identidade de sequência observado anteriormente. Como a região L2 do modelo de referência não possui estrutura resolvida, não foi possível comparar a estrutura 3D de TcDMC1 com a de humano nessa região. No entanto, devido a sua identidade de sequência elevada (76%), acredita-se que a região de Loop 2 de ligação ao DNA em DMC1 de *T. cruzi*, também deva possuir uma significativa semelhança estrutural com a de humano.

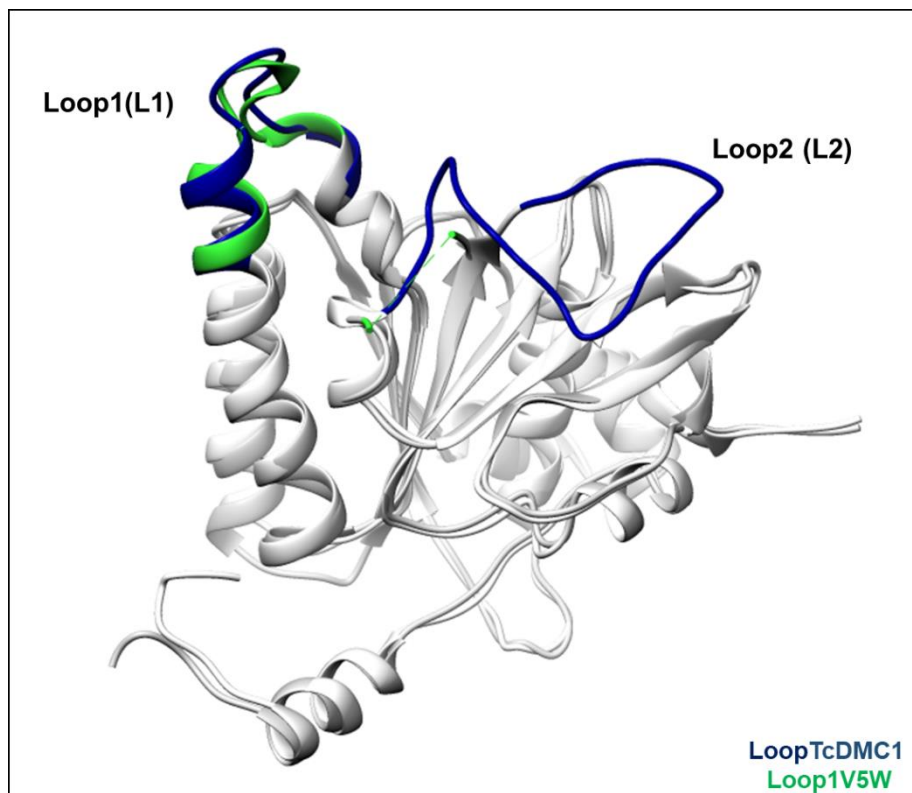


Figura 40 - Comparação estrutural entre as regiões L1 e L2 de TcDMC1 e HsDMC1 (1V5W). Alinhamento estrutural entre os modelos tridimensionais de TcDMC1 e HsDMC1 com destaque para as regiões de loop 1 e 2, sendo L1 e L2 de *T. cruzi* destacadas em azul escuro. L1 e L2 de HsDMC1 destacadas em verde claro, com ausência de estrutura na região L2 do modelo.

Para analisar os resíduos na interface de interação entre os monômeros da proteína DMC1 de *T. cruzi*, foi realizada uma modelagem para o octâmero de TcDMC1, porém as estruturas obtidas não passaram na validação estatística. Contudo, como o objetivo era apenas averiguar possíveis resíduos semelhantes nessa região, a qual não apresentou problemas, a análise foi então realizada. Ao examinar esses resíduos na interface entre os monômeros de TcDMC1, observou-se que em *T. cruzi* no lugar do resíduo Q254 presente em HsDMC1, existe o resíduo I172 que apresenta cadeia lateral apolar bem diferente da glutamina polar encontrada em humanos. Foi observado também que a interface de interação entre os monômeros de TcDMC1 apresenta o resíduo de fenilalanina (F5) e glutamato (E176) observados em HsDMC1, no entanto, o glutamato presente na estrutura de TcDMC1, não interage exatamente com os mesmos resíduos do monômero adjacente (Figura 41A e B), como ocorre em HsDMC1. Na interface de interação do octâmero de DMC1 de *T. cruzi* foi

encontrado um glutamato (E176) realizando apenas duas ligações de hidrogênio com o monômero adjacente, uma com o resíduo R112 (1.754 Å) e a outra com o resíduo Y114 (1.782 Å) (Figura 41C). Também foi observado que *T. cruzi* apresenta a substituição de um resíduo de asparagina encontrado em HsDMC1 (N163, PDB ID:1V5W) por uma serina (S83), que apesar de também possuir cadeia lateral polar, tem uma cadeia menor podendo isso influenciar na forma como os átomos de cada resíduo interagem entre eles e com os átomos dos resíduos adjacentes. Esses achados levantaram questionamentos quanto a possibilidade da recombinase DMC1 de *Trypanosoma cruzi* ser ou não capaz de formar octâmeros, já que essas três ligações de hidrogênio presentes na interface de interação entre os monômeros de DMC1 parecem ser as responsáveis pela formação dos anéis de octâmeros.

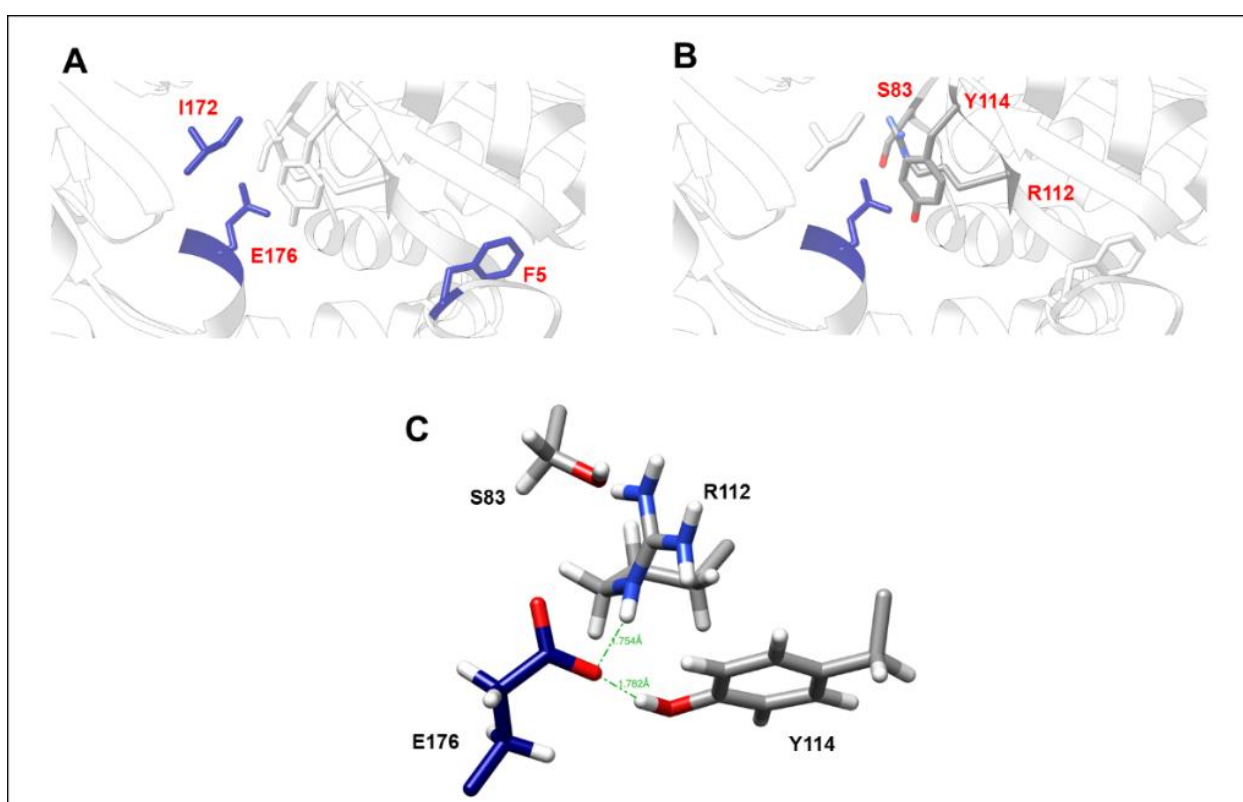


Figura 41 - Possíveis interfaces de interação entre os monômeros de TcDMC1. **A:** presença dos resíduos fenilalanina (F5), isoleucina (I172) e glutamato (E176) de TcDMC1 encontrados nas interfaces de interação entre os monômeros. **B:** resíduos de serina (S83), arginina (R112) e tirosina (Y114) de TcDMC1 que realizam interação com o resíduo E176 do monômero adjacente. **C:** ligações de hidrogênio entre resíduo E176 de um monômero e os resíduos R112 (1.754 Å) e Y114 (1.782 Å) do monômero adjacente. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas tracejadas em verde.

4.10.2. Conservação estrutural entre TcRAD51 e HsRAD51

Para a modelagem da recombinase RAD51 também foram gerados dez mil modelos com base na sequência protéica de TcRAD51 utilizando o modelo 5JZC como molde. Após análises dos dez modelos de menor valor de DOPE, o modelo escolhido foi refinado e minimizado pelo CHIMERA, sendo posteriormente submetido a análises estatísticas para validação da mesma forma como já descrito no tópico anterior para TcDMC1. Durante o processo de refinamento do modelo tridimensional TcRAD51, parte da região N-terminal correspondente a 57 resíduos e parte da região C-terminal correspondente a 21 resíduos foram editadas, chegando-se assim ao modelo final descrito neste trabalho (Figura 42).

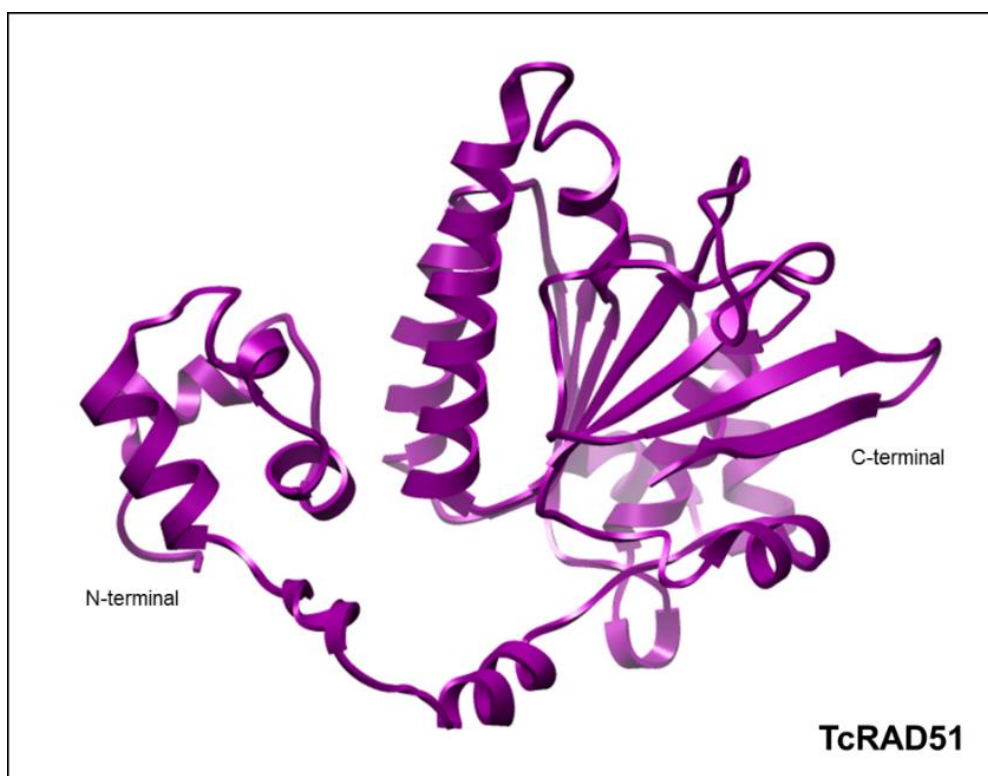


Figura 42 - Modelo tridimensional do monômero TcRAD51. Estrutura terciária da proteína RAD51 de *Trypanosma cruzi* gerada por modelagem comparativa.

Como análise de validação para o modelo TcRAD51, observou-se o gráfico de Ramachandran (Figura 43), onde 226 resíduos encontram-se em regiões mais favoráveis (86,9%), 29 resíduos em regiões adicionais permitidas (11,2%), 5 resíduos em regiões permitidas generosamente (1,9%) e nenhum resíduo em regiões desfavoráveis. Ao analisar a estrutura terciária do modelo, verificou-se que os 5 resíduos encontrados pelo gráfico de Ramachandran como estando em regiões permitidas generosamente, estão ou em região de loop ou em região de “turn” entre alfas hélices. O que pode ser observado no gráfico ERRAT

(Figura 44), onde os resíduos destacados em vermelho com valor de erro acima de 99% encontram-se na região de loop (L2). O valor médio de qualidade geral do modelo segundo validação pelo ERRAT foi de 89,011 parecido com o valor encontrado para TcDMC1 (90,377), o que indica que o modelo hipotético TcRAD51 também é um modelo confiável.

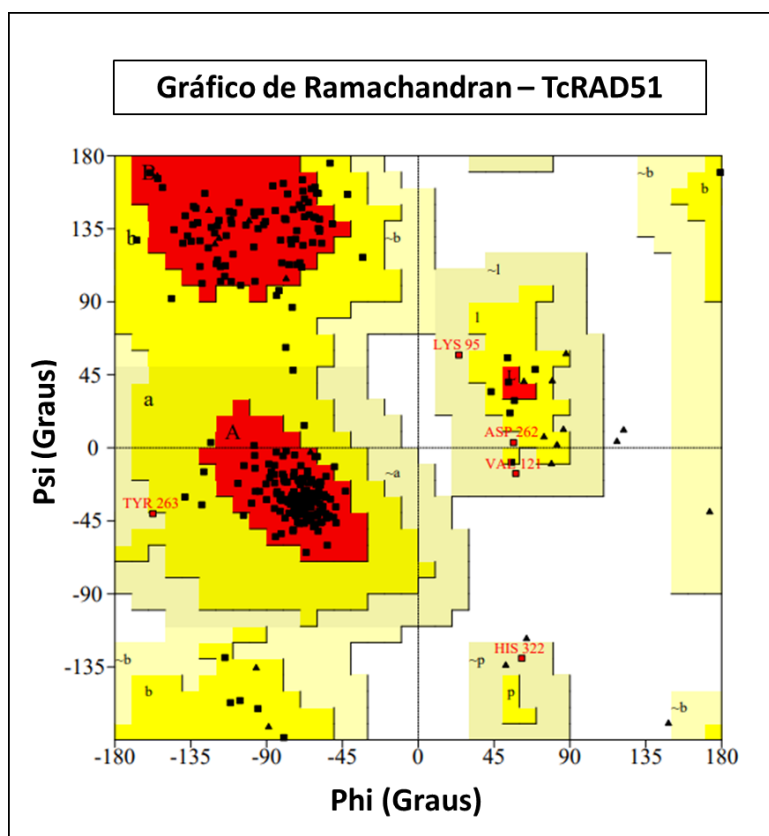


Figura 43 - Análise dos ângulos Φ e Ψ do modelo teórico de TcRAD51. Gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK. Em vermelho está representado as regiões mais favorecidas, em amarelo as em regiões adicionais permitidas, em bege as regiões permitidas generosamente e em branco as regiões desfavoráveis.

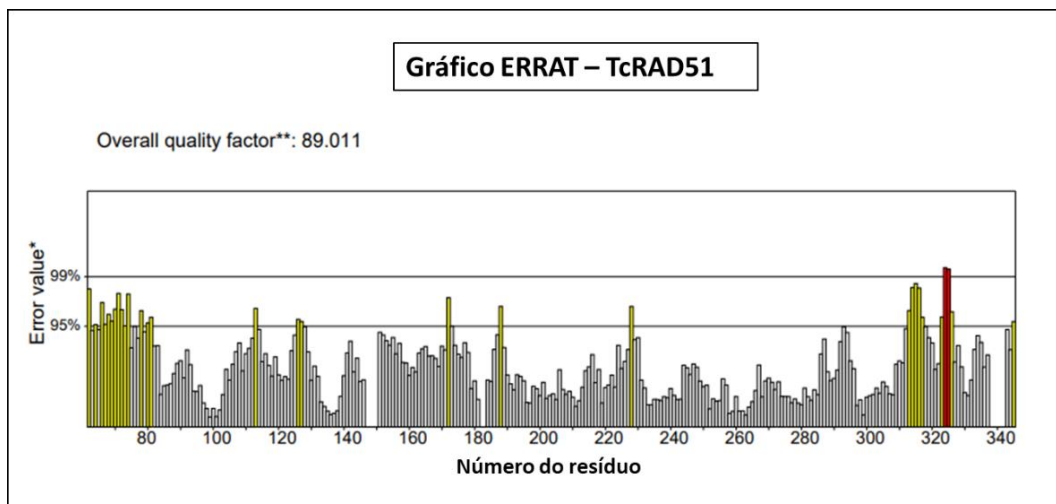


Figura 44 - Análise das interações inter-residuais do modelo teórico de TcRAD51. Gráfico de análises das interações inter-residuais gerado pelo programa ERRAT. As duas linhas representadas no eixo do erro (95% e 99%) retratam o grau de confiança de rejeição de determinadas regiões. Em branco estão representados os resíduos que ficaram abaixo dos valores de erro, em amarelos estão os resíduos que ficaram acima do erro de 95% e abaixo de 99% e os resíduos destacados em vermelho ficaram com valores de erro acima de 99%. *Overall quality factor* refere-se ao fator de qualidade geral médio da proteína (TcRAD51: 89.011). A numeração dos resíduos apresentados no gráfico começa no resíduo 58 da estrutura primária de TcRAD51 e vai até o resíduo 350.

Ao comparar o modelo TcRAD51 com o modelo HsRAD51 (5JZC), novamente foi observada uma conservação estrutural entre as recombinases de *T. cruzi* e humano. A figura 44 mostra os modelos separados TcRAD51 (Figura 45A), 5JZC (Figura 45B) e os modelos alinhados e sobrepostos (Figura 45C) com um valor de RMSD de 0.595 Å. Assim como visto em TcDMC1, o valor de RMSD para TcRAD51 também sugere uma conservação de estrutura terciária entre RAD51 do parasito e a recombinase da HR de humano.

Analizando somente as estruturas secundárias dessas recombinases foi possível observar uma semelhança estrutural, o que provavelmente pode implicar em semelhança de função. Entretanto, TcRAD51 apresenta uma alfa hélice a mais e duas folhas betas a menos quando comparada com HsRAD51. A RAD51 de *T. cruzi* apresenta 14 regiões de alfa hélice, 7 regiões de folhas betas, enquanto a recombinase de humano possui 13 alfas hélices e 9 folhas betas. Com destaque para as estruturas $\alpha 5$ e $\beta 6$ de TcRAD51 e $\beta 7$ e $\beta 8$ de HsRAD51 que parecem ser específicas de cada organismo, não se colocando estruturalmente, no entanto também podem ser artefatos da modelagem (Figura 45D e E).

Quanto as regiões L1 e L2 do modelo TcRAD51, é possível observar que há uma grande semelhança conformacional quando comparada com as regiões L1 e L2 de HsRAD51.

Na figura 46 foi observado que parte da região de Loop1 de ligação ao DNA da TcRAD51 apresenta estrutura secundária de alfa hélice ($\alpha 14$) referente a $\alpha 13$ em HsRAD51. Já a região L2, apresenta-se como região desordenada em ambas as recombinases.

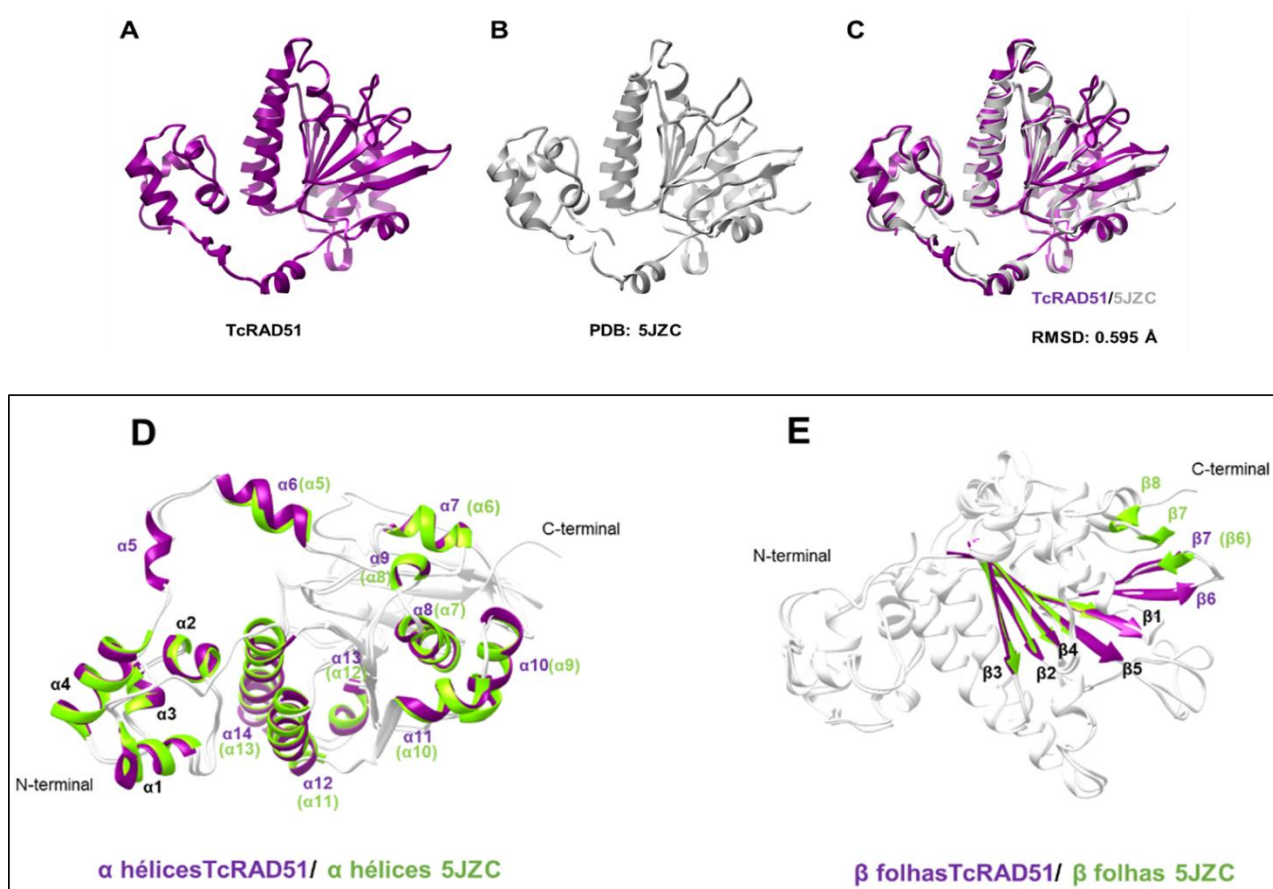


Figura 45 - Comparação entre o modelo tridimensional de RAD51 de *Trypanosoma cruzi* e de humano (5JZC), com destaque para as estruturas secundárias de alfa hélice e folha beta. A: monômero de TcRAD51. **B:** modelo de HsRAD51 retirado do PDB (5JZC). **C:** sobreposição estrutural de TcRAD51 (em magenta escuro) e HsRAD51 (cinza), com RMSD de 0.595 Å. **D:** sobreposição das estruturas de alfa hélice de TcRAD51 (em magenta escuro) e HsDMC1 (em verde limão). **E:** sobreposição das estruturas de folha beta de TcRAD51 (em magenta escuro) e HsRAD51 (em verde limão).

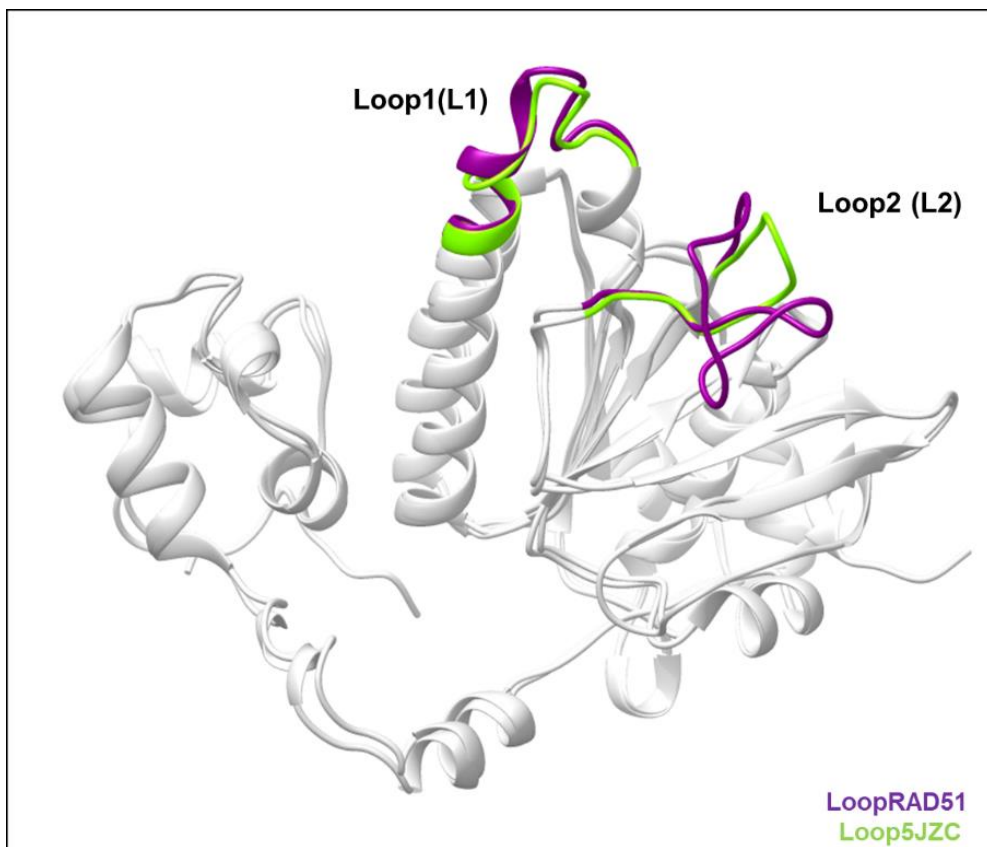


Figura 46 - Comparação estrutural entre as regiões de loop1 e loop2 de TcRAD51 e HsRAD51 (5JZC). Alinhamento estrutural entre os modelos tridimensionais de TcRAD51 e HsRAD51 com destaque para as regiões de loop 1 e 2, sendo L1 e L2 de *T. cruzi* destacadas em magenta escuro. L1 e L2 de HsDMC1 destacadas em verde limão.

Quanto a análise das interfaces de interação de RAD51 (Figura 47), ao analisar a estrutura primária e terciária do monômero de TcRAD51, foi possível observar que a proteína de *T. cruzi* também apresenta os mesmos resíduos conservados em humanos, uma lisina (K164) e uma treonina (T165) na região do motivo Walker A (158- GEFRTG**KT**-165). Já quanto a segunda interface de interação, a proteína TcRAD51 diverge da proteína humana ao apresentar parte de uma alfa hélice curta ($\alpha 5$) e um resíduo de serina no lugar da treonina (116-GFT**S**-119). Como terceira interface de interação, a recombinase de *Trypanosoma cruzi*, assim como a de humanos, também apresenta resíduos aromáticos (Y85 e F226) nas mesmas posições.

Considerando as análises realizadas com TcRAD51, é possível inferir que a recombinase RAD51 de *Trypanosoma cruzi* pode formar os filamentos helicoidais da mesma forma que a HsRAD51, com semelhança na montagem e estabilização do filamento. Além do mais, essa conservação aparente pode estar influenciando diretamente a maneira como

esses filamentos interagem com a molécula de DNA durante a recombinação homóloga em *T. cruzi*.

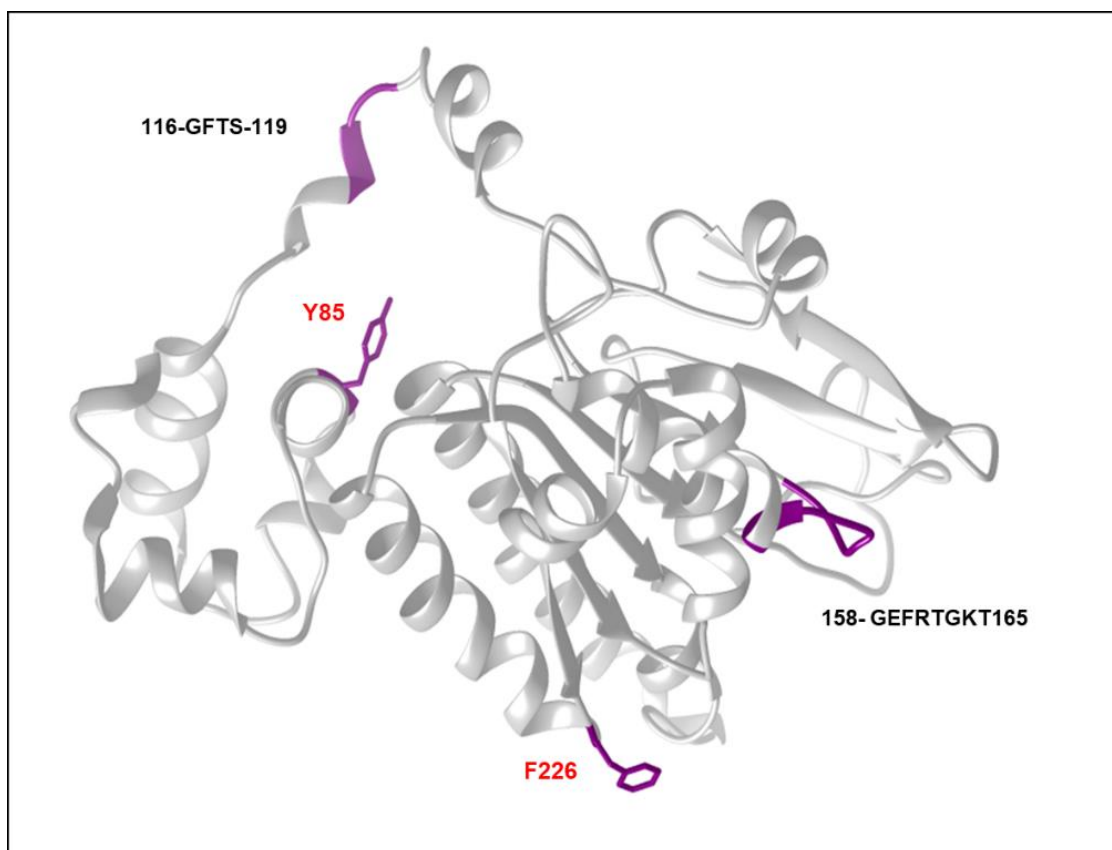


Figura 47 - Interfaces de interação entre os monômeros de TcRAD51. Representações na estrutura tridimensional de TcRAD51 das três interfaces de interação da recombinase, sendo a primeira interface referente ao motivo Walker A de TcRAD51 (158-GEFRTGKT-165), segunda interface referente a região 116-GFST-119 em TcRAD51 e a terceira interface com a presença dos resíduos aromáticos de tirosina (Y85) e fenilalanina (F2260, destacados em vermelho na figura).

Ao analisar o alinhamento das estruturas terciárias dos modelos de TcDMC1 gerados pelo MODELLER e pelo *AlphaFold* foi observado um RMSD de 0.883 Å e para a recombinase TcRAD51 um RMSD de 0.920 Å. Ao examinar os valores de ERRAT e o gráfico de Ramachandran dos modelos de DMC1 e RAD51 gerados pelo *AlphaFold*, foram observados valores de alta relevância significativa como já era esperado. TcDMC1 apresentou um ERRAT de 93,927 e apresenta 96% dos resíduos nas regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandran. TcRAD51 também apresentou valores estatísticos relevantes, com um

ERRAT de 97,917% e 92,8% dos resíduos nas regiões mais favoráveis do *plot* de Ramachandran. Ao comparar com os valores encontrados por modelagem comparativa realizada pelo MODELLER e empregados neste trabalho (tabela 4), pode-se concluir que os modelos hipotéticos para DMC1 e RAD51 de *T. cruzi* aqui descritos se assemelham aos modelos gerados pelo *AlphaFold*, que utiliza inteligência artificial com previsões de alta precisão.

Tabela 4 - Comparação estatística entre os modelos TcDMC1 e TcRAD51 gerados pelo AlphaFold e pelo MODELLER.

	TcDMC1		TcRAD51	
	ALPHAFOLD	MODELLER	ALPHAFOLD	MODELLER
ERRAT	93.927	90.377	97.917	89.011
RAMACHANDRAN (resíduos em regiões mais favoráveis)	96%	87.10%	92.80%	86.90%

A partir da validação dos modelos tridimensionais de TcDMC1 e TcRAD51 gerados e diante da possibilidade de *docking* molecular de proteínas com DNA, foi investigado se os resíduos responsáveis pela tolerância ou não ao *mismatch* identificados por Cryo-EM e já descritos para as proteínas de humano, também estariam interagindo com a molécula de DNA nas recombinases de *Trypanosoma cruzi*. Para isso foi realizado um *docking* molecular entre as recombinases (receptor rígido) de *T. cruzi* e uma fita simples de DNA (ligante flexível) utilizando o servidor HADDOCKv2.4.

4.11. Docking de TcDMC1 com ssDNA: A recombinase meiótica de *T. cruzi* interage com o DNA de forma semelhante a HsDMC1

Resíduos equivalentes identificados em DMC1 de humano, foram selecionados na estrutura terciária de DMC1 de *T. cruzi* (R154; L157; R160; Q162; P192; G193) a fim de investigar a sua interação com o DNA. Como resultado do *docking* molecular, o programa calculou 168 estruturas distribuídas em 13 clusters, onde o cluster 1 obteve a melhor pontuação pelo HADDOCK (HADDOCK score - 68.4). A estrutura de número 1 do primeiro cluster foi a escolhida para as análises com um RMSD de 0.238 Å quando comparada com o modelo de referência 7C9C utilizado nas simulações do *docking*. Como resultado observou-

se que a TcDMC1 parece interagir com a molécula de DNA através dos resíduos R154; L157; R160; P192 assim como em DMC1 de humanos e através de mais 9 resíduos, E47, F48, R148, F151, K204, P205, V189, A190 e D191 encontrados como resultado do *docking* molecular (Figura 48A e B). Dentre esses 9 resíduos encontrados em TcDMC1, a maioria encontra-se nas regiões L1 e L2 ou próximo a elas, com exceção dos resíduos E47 e F48 que se encontram na região N-terminal da proteína. Foi analisada também possíveis ligações de hidrogênio entre os resíduos encontrados na ancoragem molecular e o esqueleto fosfato do DNA, sendo que o resíduo R160 parece formar essas ligações em TcDMC1. A presença de ligações de hidrogênio entre os resíduos e a molécula de DNA foram calculadas pelo CHIMERA, onde foi possível observar a presença de uma ligação entre átomos de hidrogênio e oxigênio entre a cadeia lateral da arginina (R160) e o grupo fosfato da molécula de DNA, com distância de 1.822 Å (Figura 48C). Curiosamente, o resíduo R160 observado em TcDMC1 interagindo com o DNA é equivalente ao resíduo R242 identificado em HsDMC1 como um dos responsáveis por estabilizar o esqueleto fosfato do DNA na presença de *mismatch*. Esse achado sugere que talvez esse resíduo desempenhe o mesmo papel em DMC1 de *T. cruzi* quando na presença de *mismatch*. Outros resíduos encontrados no *docking* molecular e que também parecem ser relevantes nessa interação com o DNA, são os resíduos de fenilalanina (F48 e F151) que devido a presença de anel aromático na cadeia lateral, também podem estar formando interações do tipo *pi-stacking*²⁴ com a molécula de DNA.

Tabela 5 - Valores de interação gerados pelo HADDOCK para a ancoragem molecular de TcDMC1 com ssDNA.

TcDMC1/ CLUSTER 1	
HADDOCK score	-68.4 +/- 3.1
Tamanho do cluster	47
RMSD médio das estruturas de menor energia	2.2 +/- 2.6
Energia de Van der Waals	-35.6 +/- 2.6
Energia eletrostática	-170.0 +/- 10.0
Energia de dessolvatação	-2.3 +/- 1.3
Energia de violação de restrições	36.0 +/- 1.2
Area de superfície analisada	1030.0 +/- 61.1
Z-score	-1.5

²⁴interações *pi-stacking* ou *π-stacking* : atração não covalente entre anéis aromáticos.

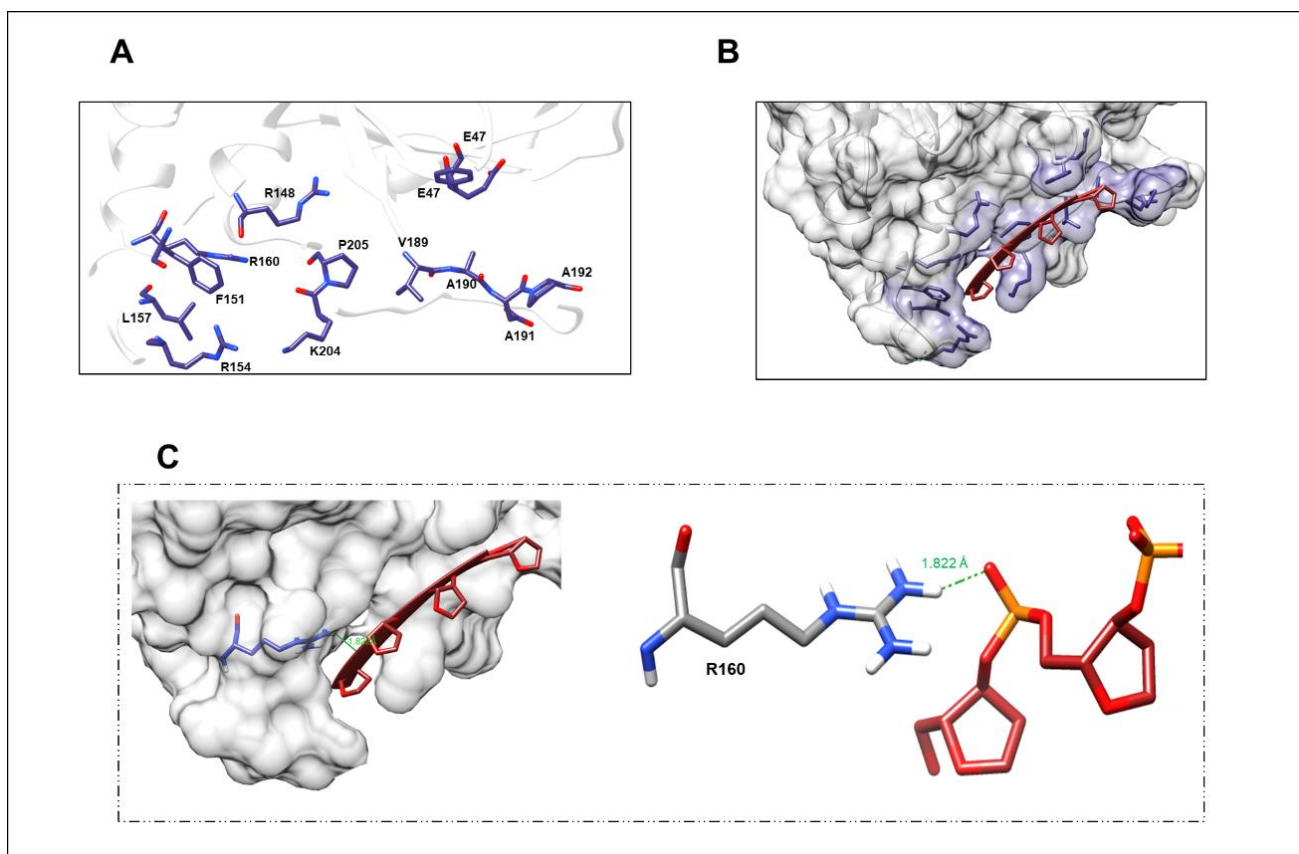


Figura 48 - Docking molecular do modelo TcDMC1 com ssDNA. **A:** Resíduos de aminoácidos presentes em TcDMC1 que realizam provável interação com a molécula de ácido nucléico. **B:** superfície molecular de TcDMC1 com destaque para a região de interação dos aminoácidos com o DNA destacado em vermelho. **C:** Interação entre o resíduo de arginina (R160) e a molécula de DNA, com destaque para a ligação de hidrogênio entre um átomo de hidrogênio da cadeia lateral da arginina e um átomo de oxigênio do esqueleto fosfato do DNA com distância de 1.822 Å. A ligação de hidrogênio está representada em linha verde tracejada.

4.12. Docking de TcRAD51 com ssDNA: Interação de TcRAD51 com DNA difere da HsRAD51

No *docking* realizado para a recombinase TcRAD51, os resíduos equivalentes a TcDMC1 na mesma região de interação com ssDNA também foram selecionados como primários (R266, L269, M274, V304 e D305) e analisados pelo HADDOCK. Como resultado foram geradas 153 estruturas divididas em 11 clusters, onde o de melhor valor de HADDOCK score foi o cluster 5 (-60.1). A estrutura de número 1 com RMSD de 0.612 Å quando comparada com o modelo 7C9C, foi a escolhida para as análises, onde foi possível observar a interação dos resíduos R266, L269, V304 e D305 com a molécula de ssDNA, assim como

observado para RAD51 de humano. Adicionalmente a estes resíduos, o HADDOCK encontrou mais 8 possíveis resíduos que também estariam interagindo com a molécula de DNA, sendo eles: N303, S307, Q309, F311, Q312, P318, H322 e I323 (Figura 49A e B). Dentre os resíduos que o programa identificou, todos encontram-se no motivo de ligação ao DNA L2 ou próximo a ele, o que de certa forma valida a metodologia de ancoragem molecular entre proteína e DNA. Ao analisar as possíveis ligações de hidrogênio entre eles e a ssDNA foram identificadas duas ligações (Figura 49C). O resíduo H322 realiza uma ligação de hidrogênio entre um átomo H da cadeia lateral da histidina e um átomo O do fosfato do DNA, com distância de 1.982 Å e o resíduo Q309 também realiza uma ligação, entre um átomo de hidrogênio da glutamina e o oxigênio do DNA, com distância de 2.035 Å. De forma interessante, esses resíduos identificados em TcRAD51 que realizam ligação de hidrogênio com o DNA, não são os mesmos encontrados em HsRAD51. No lugar da H322 (carregado positivamente) de TcRAD51, a RAD51 de humanos apresenta o resíduo N320 (polar não carregado) e no lugar da Q309 (polar não carregado) de *T. cruzi*, a proteína HsRAD51 apresenta o resíduo A17 (apolar), resíduos estes com propriedades bioquímicas totalmente diferentes. Portanto, a forma de interação de TcRAD51 com o DNA, pode ser um pouco diferente da observada em humanos. Quanto as outras interações, assim como a TcDMC1, a região de interação de RAD51 de *T. cruzi* também apresenta um resíduo de fenilalanina com cadeia lateral aromática podendo formar interações do tipo *pi-stacking* com o DNA.

Tabela 6 - Valores de interação gerados pelo HADDOCK para a ancoragem molecular de TcRAD51 com ssDNA.

TcRAD51/ CLUSTER 5	
Pontuação do HADDOCK	-60.1 +/- 4.2
Tamanho do cluster	8
RMSD médio das estruturas de menor energia	0.4 +/- 0.3
Energia de Van der Waals	-37.7 +/- 2.9
Energia eletrostática	-118.6 +/- 28.2
Energia de dessolvatação	-0.3 +/- 1.2
Energia de violação de restrições	17.2 +/- 23.9
Area de superfície analisada	1079.4 +/- 37.3
Z-score	-1.9

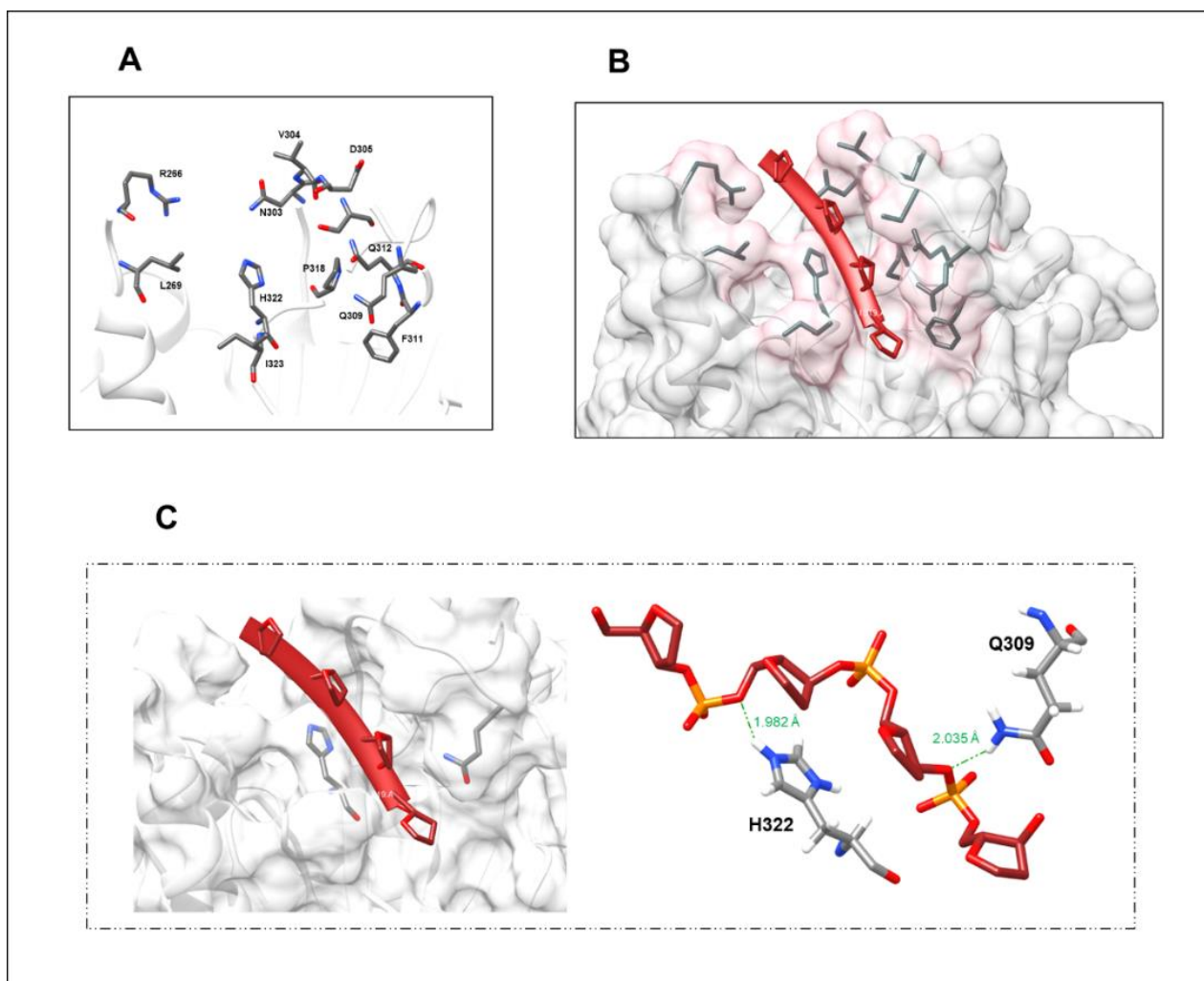


Figura 49 - Docking molecular do modelo TcRAD51 com ssDNA **A:** Resíduos de aminoácidos presentes em TcRAD51 que realizam uma provável interação com DNA de fita simples durante a recombinação homóloga. **B:** superfície molecular de TcRAD51 com destaque para a região de interação dos aminoácidos (em cinza) com o DNA destacado em vermelho. **C:** Interação entre o resíduo de histidina (H322) e glutamina (Q309) com a molécula de DNA, com destaque para as interações de hidrogênio entre os resíduos e a ssDNA com distância de 1.982 Å e 2.035 Å respectivamente. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes tracejadas.

5. DISCUSSÃO

A meiose, evento fundamental da reprodução sexuada, é considerada um atributo ancestral e ubíquo a todos os eucariotos (SPEIJER; LUKEŠ; ELIÁŠ, 2015). Evidências dessa ancestralidade tendo como origem os mecanismos de reparo do DNA, têm sido recentemente relatadas (HOFSTATTER et al., 2020; HOFSTATTER; LAHR, 2019), corroborando hipóteses há muito tempo existentes (BERNSTEIN et al., 1984; GRELON, 2016; HÖRANDL; HADACEK, 2013; HÖRANDL; SPEIJER, 2018). As reais vantagens da recombinação meiótica ao longo da evolução sempre foi uma questão de intenso debate na literatura, sendo que o alto custo da reprodução sexuada e a sua manutenção geração após geração nas espécies, ainda é considerado um dos paradoxos da evolução (HÖRANDL, 2013; HÖRANDL; HADACEK, 2020; LEHTONEN; JENNIONS; KOKKO, 2012; OTTO, 2009). A recombinação meiótica, além de ser um processo demorado que envolve a participação de várias proteínas, é considerada um mecanismo arriscado e sujeito a erros, já que a recombinação pode desfazer combinações gênicas favoráveis já estabelecidas na população. Os custos da reprodução sexuada meiótica ainda incluem a participação de dois indivíduos distintos para a formação da prole, o que na reprodução assexuada não se faz necessário (MIRZAGHADERI; HÖRANDL, 2016). No entanto, ainda assim, a reprodução sexuada parece ser um mecanismo bem conservado desde os eucariotos primitivos aos mais complexos, o que significa que a maquinaria meiótica tem sido relevante na história evolutiva desses organismos.

A hipótese de que a reprodução sexuada teria surgido a partir dos mecanismos de reparo do DNA cita as trocas genéticas da meiose como sendo inicialmente um processo de reparo a dano oxidativo que foi selecionado nas células primitivas (BERNSTEIN; HOPF; MICHOD, 1989), onde a necessidade de reparar o DNA lesionado dependia de um DNA homólogo não lesionado. Sendo, então, a variabilidade genética proporcionada pela meiose, uma consequência direta desses mecanismos de reparo. Uma das evidências de que a meiose não teria surgido para gerar variabilidade é a baixa frequência de *crossing over* observado durante as resoluções das junções Holliday da meiose, sendo maior a quantidade de eventos não *crossing over*. Contudo, apesar de uma menor ocorrência, apenas as junções resolvidas com trocas genéticas em ambos parentais são as responsáveis pelo surgimento de novas combinações (HÖRANDL; HADACEK, 2013).

O modelo endossimbiótico de origem dos eucariotos fornece subsídios para a hipótese da reprodução sexuada como uma consequência dos mecanismos de reparo, onde o canibalismo entre células procarióticas teria sido o propulsor evolutivo para a recombinação meiótica (MARGULIS L; D., 1986; SAGAN; MARGULIS, 1987). A evolução de organelas, como as mitocôndrias, no metabolismo das células protoeucarióticas, ocasionou um aumento de espécies reativas de oxigênio e radicais livres intracelular, os quais são notoriamente conhecidos como os principais agentes internos causadores de danos no DNA (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012; HÖRANDL; SPEIJER, 2018). Estima-se que os seres humanos apresentem diariamente 10.000 lesões oxidativas no DNA por célula (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993), sendo maior em organismos que possuem o metabolismo mais acelerado como nos ratos por exemplo, que apresentam diariamente 100.000 lesões por célula (BERNSTEIN; BERNSTEIN; MICHOD, 2012).

A maioria dos danos oxidativos prejudica apenas uma das fitas do DNA mas uma pequena parcela acaba atingindo as duas fitas da molécula podendo gerar quebras duplas, que são altamente letais (MASSIE; SAMIS; BAIRD, 1972). Além disso, foi visto que 1% das lesões de fita simples acabam sendo convertidas em aproximadamente 50 DSBs por célula, a cada divisão celular, o que reflete no genoma humano por exemplo, como sendo uma quebra dupla a cada 10^8 pares de base (VILENCHIK; KNUDSON, 2003). Fato é que os danos oxidativos a que a molécula de DNA dos protoeucariotos estava sujeita, após a utilização do oxigênio na respiração celular aeróbica, podem ter direcionado os mecanismos de recombinação por trocas genéticas. Portanto, abrindo espaço para a seleção de eventos cada vez mais complexos ao longo da evolução, culminando na atual recombinação por trocas genéticas meióticas.

Já se sabe que diferentes organismos, em condições de estresse, podem apresentar elevadas taxas de quebras duplas no DNA (AGRAWAL; HADANY; OTTO, 2005), que a depender da fase do ciclo celular, são reparadas por recombinação homóloga, uma das vias de reparo mais conservada, encontrada em todos os seres vivos (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008; SUNG; KLEIN, 2006). As principais proteínas envolvidas no reparo por recombinação homóloga também são encontradas na recombinação meiótica em eucariotos, o que revela o passado ancestral da meiose (ROTHSCHILD, 1999). As duas recombinases meióticas presentes em eucariotos, DMC1 e RAD51, e seus homólogos, RecA em bactéria e RadA em archaea, são proteínas fundamentais para que recombinação homóloga ocorra. Sendo que a recombinase DMC1 até onde se sabe, atua exclusivamente na meiose (BISHOP et al., 1992).

A semelhança de função e a conservação de domínios proteicos dessas recombinases dependentes de ATP, as classificam como membros da superfamília das RecA/Rad51 (BELL; KOWALCZYKOWSKI, 2016; LIN et al., 2006) ou da família das proteínas de trocas genéticas como também são conhecidas (SEITZ; KOWALCZYKOWSKI, 2000).

Estima-se que no início da evolução dos eucariotos, o gene RadA das archeas passou por um processo de duplicação dando origem aos genes RAD51 e DMC1 nos eucariotos atuais (LIN et al., 2006). Partindo da premissa que DMC1 atua especificamente na recombinação meiótica, é de se questionar se todos os organismos que apresentam DMC1 em seus genomas também seriam capazes de realizar trocas genéticas por meiose. Diferente do que ocorre nos eucariotos multicelulares, onde a reprodução sexuada prevalece e a formação dos gametas é de fácil distinção, nos eucariotos unicelular, a reprodução majoritariamente assexuada e a dificuldade em distinguir possíveis gametas, torna esses organismos verdadeiras incógnitas da evolução. Porém, algumas evidências da atividade de DMC1 e eventos de trocas genéticas em eucariotos unicelulares têm trazido luz a questões sobre recombinação meiótica nesses organismos, como visto nas amebas (KELSO et al., 2015), em leishmania (TABBABI et al., 2020; TELITTCHENKO; DESCOTEAUX, 2020), em plasmodium (MLAMBO; COPPENS; KUMAR, 2012) e em tripanossoma (PEACOCK et al., 2011, 2014, 2021).

Questionamentos sobre a forma de reprodução e as estratégias dos mecanismos recombinacionais no eucarioto unicelular *Trypanosoma cruzi* também fazem parte dessa incógnita evolutiva, a qual tentamos explorar um pouco neste trabalho.

Ao analisarmos o padrão de crescimento do *Trypanosoma cruzi* modificado para superexpressar o gene DMC1, não foi possível observar nenhuma interferência significativa quando comparado ao crescimento das células selvagens (Figura 13A), o que curiosamente também foi observado quando as células foram submetidas a radiação ionizante. As células de *T. cruzi* irradiadas com 500Gy cresceram de forma semelhante ao WT irradiado (Figura 14A). Sabe-se que a radiação ionizante é capaz de danificar bases nitrogenadas da molécula de DNA, como também é capaz de gerar quebras de fita simples devido a radiólise da água (WARD, 1994). Elevadas doses de radiação são responsáveis por causar quebras duplas no DNA, causando danos irreversíveis se não reparados. Além disso, acredita-se que a cada DSB gerada pela radiação ionizante, existam mais 10 quebras de fita simples na molécula (MA et al., 2012; MEHTA; HABER, 2014), ou seja, os danos da radiação ionizante são de certa forma acumulativos e altamente agressivos às células. O fato do parasito superexpressor da recombinase DMC1 não apresentar vantagens em relação ao WT quando irradiados, sugere que essa proteína talvez não esteja desempenhando um papel no reparo

por recombinação homóloga, já que de forma diferente quando o parasita superexpressa a recombinase de reparo, RAD51, o seu perfil de crescimento melhora em relação ao WT também irradiado, como já foi visto anteriormente em trabalho do nosso grupo (REGIS-DASILVA et al., 2006).

O DNA sempre esteve sujeito a diversos tipos de agentes causadores de danos, contudo, as estratégias evolutivas dos organismos em reparar essa molécula de forma eficiente tem preservado a integridade genômica dos seres vivos há bilhões de anos. Uma dessas estratégias compreendem os mecanismos de sinalização do dano (DDR), onde em eucariotos essa sinalização acontece principalmente por proteínas cinases, que regulam e sincronizam os mecanismos de reparo do DNA com processos como replicação e transcrição. As proteínas cinases fazem o intermédio da comunicação entre o dano e o reparo, por meio de modificações pós-traducionais ao fosforilar grupos hidroxilas de resíduos como serina, treonina e tirosina, podendo atuar também na regulação alostérica de outras cinases (KUNG; JURA, 2016). Em tripanossomatídeos como *T. brucei* e *Leishmania*, as cinases ATR e ATM parecem ter papéis fundamentais nessa sinalização (DA SILVA RB et al., 2018; MARIN et al., 2020), todavia ainda não se sabe sobre a função delas em *T. cruzi*. Em eucariotos, a cinase ATM é recrutada na sua forma dimérica inativa através do complexo MRN para os locais de quebras duplas no DNA, onde então passa ao seu estado monomérico ativo, sendo capaz de se autofosforilar e fosforilar vários substratos, como a histona H2AX, o supressor tumoral p53 e a cinase de *checkpoint* do ciclo celular, CHK2. Cinase esta que pode interromper o ciclo celular nas fases G1/S ou G2/M, direcionando assim qual mecanismo de reparo a DSB será utilizado, NHEJ ou HR (AWASTHI; FOIANI; KUMAR, 2015).

Dentro desse contexto, observamos que células de *T. cruzi* deficientes para a atividade cinase de ATM apresentaram um crescimento prejudicado quando comparadas ao WT (Figura 13B). Como a ativação de ATM está envolvida no processo de sinalização à DSBs e consequentemente ativação das vias de reparo a HR, o fato das células ATM+/- crescerem de forma mais lenta que as células selvagens, sugere que o processo de sinalização e reparo a possíveis DSBs endógenas esteja prejudicado nestas células. Esta desvantagem na sinalização do dano pode ser observada com maior evidência quando estas células foram submetidas a radiação ionizante. A população de células ATM+/- mostrou uma estagnação no seu crescimento por um período de até 15 dias após irradiação, sendo muito mais sensível que as células selvagens irradiadas (Figura 14B). O mesmo padrão de sensibilidade das células mutantes foi observado quando as mesmas foram tratadas com o agente alquilante MMS, capaz de gerar quebras simples e duplas na forquilha de replicação. Células ATM+/- tratadas com 1,5mM de MMS apresentaram um perfil de crescimento alterado quando comparadas ao WT, sendo possível observar um atraso na retomada do seu crescimento

(Figura 15A). Resultado que se sustenta no fato da atividade cinase de ATM ser primordial a DDR no início da via de reparo a quebra dupla. Relatos do papel de ATM na fosforilação de BRCA1 (CORTEZ et al., 1999; GATEI et al., 2000; XU et al., 2002) evidenciam também a sua importância na ativação indireta de efetores da via HR, já que BRCA1 por sua vez interage com BRCA2 e (CHEN et al., 1998) com o complexo MRN (ZHONG et al., 1999), ambos fundamentais na sinalização e efetivação da via HR. Com base no perfil de crescimento das células ATM+/-, é de se inferir que a cinase ATM possui um papel fundamental na sinalização de *Trypanosoma cruzi* para o reparo por recombinação homóloga, o que complementa assim os dados da literatura sobre cinases em tripanossomatídeos (SILVA et al., 2021). De forma divergente, células ATM +/- tratadas com 20mM de hidroxureia não apresentaram diferenças no seu perfil de crescimento (Figura 15B), sugerindo que o estresse replicativo provocado pela droga não é reparado por recombinação homóloga. Fato que corrobora trabalhos anteriores com células heminocutes para recombinase RAD51, onde os parasitas Rad51+/- não apresentaram sensibilidades para HU quando comparados ao WT (GOMES PASSOS SILVA et al., 2018).

Durante a sinalização para o reparo de quebra dupla no DNA, a fosforilação da histona H2AX, observada já nos primeiros minutos após irradiação (LÖBRICH et al., 2010) é de fundamental importância na comunicação “dano versus reparo”, tendo a cinase ATM papel principal nessa fosforilação. As proteínas histonas estão associadas ao DNA nuclear de todos os eucariotos, compactando-os em cromatina que possui papel fundamental em processos de transcrição e replicação do DNA (WOLFFE; HAYES, 1999). A fosforilação da histona variante H2AX causa descondensação da cromatina, o que permite o rápido recrutamento de fatores de sinalização e efetores do reparo. Essa fosforilação é considerada um dos marcadores moleculares para DSBs em diversos organismos, sendo a histona fosforilada na serina 129 em leveduras (DOWNS; LOWNDES; JACKSON, 2000), na serina 139 em mamíferos (BURMA et al., 2001) e na treonina 130 em tripanossomatídeos (GLOVER; HORN, 2012).

Quando analisamos a quantificação relativa da histona H2A fosforilada em cepa híbrida (CL Brener) e não híbrida (Dm28c) de *T. cruzi*, submetidas a radiação gama, podemos observar um perfil de cinética de H2A bem semelhante entre as duas, com maiores níveis de fosforilação nas primeiras 24h (Figura 16). No entanto, quando comparamos as quantidades de H2A entre as células, observamos que CL Brener apresentou maiores níveis da histona fosforilada que Dm28c, em todos os tempos analisados (Figura 16C e F). Esse achado corrobora os dados da literatura, onde já foi visto que células de *T. cruzi* CL Brener irradiadas apresentam uma melhor resposta à radiação ionizante (ALVES et al., 2018). Portanto,

sugerimos assim que a sinalização para o reparo HR em *Trypanosoma cruzi* pode estar acontecendo de forma diferente entre cepas híbridas e não híbridas.

Para células de *T. cruzi* modificadas, quanto a superexpressão de DMC1, conseguimos observar uma rápida sinalização de H2A após irradiação (Figura 17). Os parasitos apresentaram um pico de histona fosforilada já nos primeiros 30 minutos após a radiação, de forma diferente do observado nas células WT (Dm28c) irradiadas, onde o pico de fosforilação foi com 24 horas. Esses achados sugerem que a recombinase DMC1 pode estar interferindo de alguma forma na sinalização inicial de H2A, seja via ATM ou ATR, já que a outra cinase da DDR, a DNA-PKc, parece estar ausente nesse parasito, segundo retrata a literatura (SILVA et al., 2021). Além disso, quando comparamos a quantidade de H2A fosforilada das células superDMC1 com as células selvagens Dm28c, foi visto que as células que superexpressam o gene de meiose, apresentaram maiores níveis da histona fosforilada em todos os tempos analisados (Figura 17C e F). Apesar dessas células modificadas possuírem uma sinalização para DSB mais rápida que as células selvagens, o fato delas manterem quantidades de H2A fosforilada maiores que o WT por até 5 dias após irradiação, nos leva a supor que células superDMC1 podem apresentar uma maior quantidade de eventos de DSB em seu genoma ou uma dificuldade de reparar as lesões existentes.

Já quando analisamos células de *T. cruzi* deficientes para a recombinase RAD51, a cinética de H2A foi diferente quando comparada ao WT (CL Brener) e as células superDMC1. As células Rad51+/-, apresentaram uma maior quantidade de histona fosforilada no tempo de 24h após a radiação (Figura 18), semelhante ao pico de H2A fosforilada encontrada no WT CL Brener, no entanto, o aumento abrupto da expressão de H2A nos tempos iniciais e a sua redução drástica nos tempos finais analisados divergiram do perfil de expressão das células selvagens, onde o aumento e a redução nos níveis da histona fosforilada aconteceram de forma gradual. Essa observação na cinética de H2A em células deficientes para RAD51 pode explicar o seu crescimento prejudicado em relação ao WT quando submetidos a radiação ionizante, como já visto pelo nosso grupo (GOMES PASSOS SILVA et al., 2018). As células deficientes para RAD51, provavelmente possuem uma sinalização primária para DSB desvantajosa. A depleção da recombinase diminui a eficiência do reparo HR nessas células, o que de certa forma deve estar interferindo na sinalização inicial de H2A. Possibilidade esta que acaba refletindo na curva de sobrevivência, onde observamos uma população de parasitos estagnada por um longo período após irradiação (Figura 18A e D). Logo, o pico de H2A em 24h visto nestas células seria devido ao acúmulo de DSBs não reparadas nos tempos iniciais e a queda nos níveis de H2A fosforilada logo após 24h não seria devido ao reparo das quebras duplas em si, pois se isso estivesse acontecendo poderia ser observado na curva de sobrevivência com a retomada do crescimento. Entretanto, não é isso que acontece, as

células não retomam o seu crescimento normal mesmo após a redução dos níveis de H2A fosforilada, sendo isso provavelmente devido a uma falha na comunicação “dano versus reparo” nessas células. Outra evidência dessa sinalização prejudicada, foi observada ao compararmos a quantidade relativa de H2A de Rad51+/- e WT em todos os tempos analisados, onde células heminocautes para RAD51 apresentaram menores níveis da histona fosforilada do que as células selvagens (Figura 18C e F).

Quanto a cinética analisada nas células deficientes para a função cinase de ATM, não conseguimos encontrar um padrão de H2A fosforilada, com níveis de expressão relativa mais elevados variando entre 30min e 48h após serem submetidas a radiação ionizante (Figura 19). Apesar desses resultados não nos apresentarem um perfil cinético característico de H2A nestas células, ao estimarmos a quantidade de histona fosforilada em relação às células selvagens (CL Brener), nos diferentes tempos, também foi possível observar menores níveis de H2A, tal como observado para células Rad51+/- . O que já era esperado, visto que as células heminocautes para ATM possuem o domínio cinase depletado, ou seja, os baixos níveis de H2A fosforilada observados nestas células apenas refletem a depleção funcional da atividade cinase de ATM sobre H2A, com uma menor taxa de fosforilação. Dado que corrobora a relação funcional de ATM e sua capacidade de fosforilar a histona variante H2A visto também em outros organismos (BURMA et al., 2001).

Uma característica comum observada na cinética de H2A fosforilada para células de *T. cruzi* submetidas a radiação gama foi o fato desse marcador de DSB ser detectado mesmo até 5 dias após radiação. Em praticamente todas as células analisadas neste trabalho, níveis constantes de H2A foram observados ao longo dos dias, com exceção para células Rad51+/- , deficientes no reparo HR e que provavelmente apresentam menos eventos de recombinação. Em trabalho recente do nosso grupo foi observado que a recombinação é capaz de induzir processos de dormência em *Trypanosoma cruzi*. No trabalho foi visto que a radiação gama induz dormência em *T. cruzi* e que células heminocautes para a recombinase RAD51 apresentaram menos eventos de dormência, enquanto que cepas híbridas, as quais possuem uma maior expressão de RAD51, apresentaram uma maior taxa de células dormentes (RESENDE et al., 2020). Correlacionando os dados de cinética de H2A observados aqui este trabalho, com os dados de dormência já visualizados nesse parasito, podemos inferir que H2A fosforilada talvez possa funcionar como um marcador de células dormentes em *Trypanosoma cruzi*, onde a sinalização prolongada de reparo a DSB pode estar induzindo eventos de dormência neste parasito. Uma forma de evidenciar isto seria separar células CFSE positivas (dormentes) por citometria de fluxo (“*sorting*”) e analisá-las quanto a marcação para H2A fosforilada.

Em tripanossomatídeos, o mecanismo de transcrição gênica acontece de forma policistrônica, onde a RNA polimerase II transcreve de uma vez só várias unidades gênicas em um único transcrito primário. Transcrito este que passará pelo processo de *trans-plicing* e poliadelinação originando transcritos maduros (mRNA individuais). Nesses organismos, a regulação gênica ocorre a nível pós-transcricional, onde as etapas de processamento, tradução e degradação dos transcritos maduros (mRNA) são fundamentais (CLAYTON, 2019).

Ao verificarmos o nível de alguns transcritos (mRNA) envolvidos na recombinação, foi possível perceber que a superexpressão do gene DMC1 não interferiu nos níveis do transcrito da recombinase RAD51, pois células superDMC1 expressaram uma quantidade relativa de mRNA-RAD51 semelhante a encontrada no WT Dm28c (Figura 22B). O contrário também foi observado, sendo que a superexpressão de RAD51 não influenciou em nada a expressão do transcrito de DMC1 (Figura 21B e D). O que indica que na ausência de danos exógenos, a superexpressão de uma não interfere na expressão basal da outra. A mesma relação não pôde ser observada quando se analisou o transcrito de ATM nestas células. O parasita superDMC1 apresentou um aumento nos níveis de mRNA-ATM (Figura 23B), reafirmando a possibilidade destas células apresentarem mais eventos de DSBs em seu genoma, como já mencionado acima. Se as células apresentam mais quebras duplas e não possuem nenhum problema de sinalização, logo espera-se que também apresentem uma maior expressão das cinases da via HR. Já para as células de *T. cruzi* superexpressoras de RAD51 construídas na cepa CL Brener, não foi possível observar esse aumento na expressão do transcrito de ATM, sendo igual aos níveis encontrados no WT CL Brener (Figura 23E e F). Quanto aos níveis de mRNA-ATM em células superRAD51 construídas na cepa Dm28c (Figura 23G e H), o transcrito apresentou uma redução, o que ratifica os baixos níveis de H2A encontrado nessa cepa quando comparada a cepa CL Brener (Figura 16). Além disso, o fato de não termos conseguido construir um superexpressor de DMC1 em CL Brener, pode ser um indicativo do papel regulador do gene meiótico em eventos de recombinação em cepas híbridas. Como já relatado em trabalhos do nosso grupo, cepas híbridas de *Trypanosoma cruzi* apresentam mais eventos de trocas genéticas do que cepas não híbridas (ALVES et al., 2018), portanto, o fato da cepa Dm28c, não híbrida, apresentar uma menor expressão de ATM e de H2A, pode sugerir uma menor quantidade de DSBs nessas células, o que consequentemente geraria menos eventos de recombinação. Fato este que pode ter facilitado a construção do parasita superexpressor de DMC1 nessa cepa. Os baixos níveis de ATM e H2A observados na cepa Dm28c também reforçam a ideia de que cepas não híbridas de *T. cruzi* apresentam uma resposta a DSB prejudicada (ALVES et al., 2018)

Células deficientes para RAD51 apresentaram uma redução nos níveis de mRNA-ATM (Figura 23F), o que explica talvez a cinética de H2A prejudicada nestas células, tendo uma expressão elevada em 24h seguida de uma drástica redução. Se a célula Rad51+/- expressa menos transcritos para ATM subentende-se que a sua sinalização para DSBs por H2A tende a ficar prejudicada. Quando a expressão de mRNA-DMC1 foi analisada nestas células, foi possível observar em uma das replicatas, um aumento nos níveis desse transcrito (Figura 21F), nos levando a pensar quais seriam os motivos da depleção da recombinase RAD51 aumentar a expressão da recombinase DMC1. Como visto na cinética de H2A, as células Rad51+/- assim como as células ATM+/- parecem apresentar uma sinalização para DSB deficiente, refletida nos baixos níveis de H2A em ambas as células e nas curvas de sobrevivência sem retomada de crescimento por vários dias após irradiação. Com uma sinalização desvantajosa e um reparo HR deficiente, uma possibilidade seria estas células começarem a expressar a recombinase DMC1 na tentativa de lidar com as DSBs endógenas mal resolvidas seja por mitose ou por meiose. Como RAD51 e DMC1 são recombinases de mesma função e ainda é completamente desconhecido o papel de DMC1 em *Trypanosoma cruzi*, pode ser que o parasito Rad51+/- que tem uma expressão reduzida da recombinase, esteja tentando compensar a deficiência desta aumentando a expressão da outra recombinase, DMC1, quando necessário. Por exemplo, atuando em processos de recombinação homóloga provenientes do próprio metabolismo do parasito. Essa sinalização para o recrutamento de DMC1 nas células Rad51+/- pode estar acontecendo através da cinase ATR, pois como já foi visto no *Trypanosoma brucei*, a cinase ATR também pode sinalizar para efetores da via HR (MARIN et al., 2020). O mesmo se aplica as células ATM+/- , as quais não só apresentaram elevados níveis do transcrito DMC1 (Figura 21F) como também apresentaram um aumento do transcrito RAD51 (Figura 22D). Como o gene ATM está no início da via de recombinação homóloga sendo o responsável pela ativação da cascata de sinalização na presença de DSBs, a deficiência da atividade cinase pode levar a depleção da ativação de alguns efetores da HR via ATM, o que de forma indireta levaria ao acúmulo de DSBs endógenos ao longo do tempo. Consequentemente, o recrutamento das recombinases poderia estar sendo amplificado por outras vias tendo assim a sua expressão gênica aumentada nessas células.

Na busca por mais evidências sobre a regulação desses transcritos em *T. cruzi*, analisamos a expressão deles 4h após as células serem submetidas a 500Gy de radiação gama (Figura 24), onde foi possível observar um aumento nos níveis de mRNA-DMC1 nas células selvagens CL Brener (corroborando os dados de RNAseq visto no apêndice deste trabalho), em Dm28c, e também nas células ATM+/- (Figura 24A e B) o que evidencia a nossa hipótese de DMC1 está envolvida na rápida sinalização para DSB, vista na cinética de H2A

em células superDMC1. A expressão de ATM em células selvagens CL Brener e Dm28c e em células modificadas superDMC1 e ATM+/-, apresentou uma redução 4h após irradiação (Figura 24C e D). Como não se tem clareza do quão rápida seria a sinalização via ATM em *T. cruzi*, pode-se inferir que talvez essa sinalização aconteça imediatamente após a quebra do DNA, tal como ocorre com a bactéria *Deinococcus radiodurans* quando submetida a radiação, onde o reparo a DSB ocorre já na primeira hora após o dano (KRISKO; RADMAN, 2010). Tendo assim, *T. cruzi* uma regulação negativa para mRNA-ATM no tempo de 4h após irradiados. O aumento da expressão de mRNA-DMC1 nessas primeiras 4h pode estar regulando negativamente a expressão de ATM, seja por induzir a degradação do transcrito ou por inibição do processamento do mRNA.

Diante das diversas possibilidades de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, com este trabalho obtivemos apenas algumas pistas de como as recombinases da HR, DMC1 e RAD51 e o transdutor de sinal a DSB, ATM, podem estar atuando em *T. cruzi*, nos sugerindo a existência de uma possível regulação entre eles.

Em virtude da participação das enzimas da recombinação nos eventos meióticos e frente as evidências da ancestralidade da reprodução sexuada dos eucariotos, vários genes expressos especificamente durante a meiose têm composto o chamado “kit ferramentas da meiose”, um conjunto de proteínas específicas altamente conservadas em eucariotos e necessárias para que a recombinação meiótica aconteça (HOFSTATTER et al., 2020). Dentre elas encontram-se proteínas envolvidas com eventos de plasmogamia como HAP2, auxiliando na fusão dos gametas, SPO11 como responsável pela formação das quebras duplas da meiose, proteínas como MSH4 e MSH5, que são capazes de reconhecer as junções Holiday e estão envolvidas na resolução de *crossing over*. Além da proteína ZIP4 associada com formação do complexo sinaptonêmico da meiose, DMC1 como recombinase específica, HOP2 e MND1 que formam um complexo responsável por garantir o correto pareamento homólogo durante a meiose, dentre outras. Sendo essas últimas, consideradas um fator auxiliar a DMC1 durante a busca e invasão pela fita homóloga. O heterodímero HOP2-MND1, possui uma alta afinidade de ligação com os filamentos pre-sinápticos formados por DMC1, o que garante a estabilidade dos nucleofilamentos e a eficiência da recombinação durante a meiose (BROOKS CRICKARD et al., 2019). Fazendo uso desse “kit ferramentas da meiose”, avaliamos também a expressão dos transcritos gênicos de HOP2 e MND1 (Figura 31), em células superDMC1 e ATM+/-, onde não foi possível perceber nenhuma diferença na expressão de mRNA-HOP2 em ambas as células modificadas. Já quando averiguamos a expressão do transcrito MND1, observamos um aumento nas células superexpressoras de DMC1 (Figura 31F) e uma diminuição nas células heminocautes para a cinase ATM (Figura 31G). O que contraria o esperado para células que provavelmente possuem mais eventos de DSB como sugerido

neste trabalho para *T. cruzi* superDMC1 e ATM+/- . Já que mais eventos de recombinação meiótica poderiam estar acontecendo, logo mais HOP2 e MND1 seriam requeridas em ambas as células. Porém, a expressão desses transcritos não foi avaliada em células submetidas a agentes danosos, como a radiação ionizante, podendo esse ser um fator indutivo na expressão desses genes. Tal como ocorre na planta de gênero *Arabidopsis*, onde a radiação por raios gama parece induzir a expressão de MND1 (DOMENICHINI et al., 2006). Existe ainda a possibilidade dos transcritos HOP2 e MND1 não estarem atuando apenas em processos de recombinação meiótica nesse parasito, como já sugerido para outros organismos (HOFSTATTER et al., 2020).

Diante das evidências dos eventos de trocas genéticas (ALVES et al., 2018; GAUNT et al., 2003) e de híbridos naturais de *Trypanosoma cruzi*, (BERRY et al., 2019; SCHWABL et al., 2019; STURM et al., 2003), decidimos analisar o processo de fusão celular através de misturas entre parasitos modificados para as recombinases DMC1 e RAD51. Onde encontramos mais uma evidência de possíveis processos de hibridização, dessa vez em parasitos que superexpressam o gene de meiose DMC1. Ao analisar as misturas entre células superDMC1 marcadas distintamente pelo corante fluorescente CellTrace, foi possível verificar uma elevada porcentagem de híbridos por microscopia de fluorescência (15%) quando comparada com a mistura entre células selvagens Dm28c (3,7%). Porcentagem essa que foi aumentada ao misturar células superDMC1 com o WT Dm28c (18,59%), sugerindo o que parece um efeito aditivo no processo de fusão desses parasitos (Figura 26). As porcentagens dos híbridos de superDMC1 (33,7%) e de células selvagens Dm28c (0,2%) obtidas por citometria de fluxo (Figura 27), apenas confirmaram os dados obtidos por microscopia, o que de certa forma valida o ensaio de fusão celular em *T. cruzi* empregado neste trabalho. Quando as misturas foram realizadas entre células superRAD51 (Dm28c) e analisadas por microscopia não foram observadas formação de híbridos, diferente de quando essas células foram misturadas com células superDMC1 (Dm28c), onde foi observado um aumento no processo de fusão (3,73%), indicando a interferência da recombinase DMC1 em possíveis eventos de fusão citoplasmática neste parasito.

Ao analisarmos a formação de híbridos em células superRAD51 construídas na cepa CL Brener, também não foi possível observar eventos de fusão celular, divergindo dos dados da literatura no que diz respeito a trocas genéticas em células superexpressoras de RAD51 nessa cepa. Por meio de ensaios de incorporação de análogos de timidina, células superexpressoras de RAD51 (CL Brener) apresentaram uma porcentagem de híbridos elevada (10%) quando comparadas ao WT no tempo de 24h (ALVES et al., 2018). No entanto, como o tipo de hibridização abordado aqui neste trabalho foi diferente (híbridos por fusão celular), do citado na literatura (híbridos por trocas genéticas), pode ser que as recombinases

RAD51 e DMC1 de *T. cruzi* estejam desempenhando papéis recombinacionais em diferentes mecanismos, como por exemplo na recombinação por trocas genéticas não meióticas (RAD51) e nas trocas genéticas meióticas (DMC1) que compreenderia formação de gametas, fusão celular, cariogamia e meiose. Sendo assim a superexpressão de DMC1 fundamental nesses processos.

Apesar de não observarmos eventos de fusão citoplasmática em células superexpressoras de RAD51 neste trabalho, existe ainda a possibilidade da recombinase RAD51 de *T. cruzi* estar atuando em mecanismos recombinacionais de parassexualidade. Possíveis eventos de recombinação parassexual envolvendo tripanossomátídeos têm sido relatados em *T. cruzi* (GAUNT et al., 2003; SCHWABL et al., 2019) e em *Leishmania* (STERKERS et al., 2014), onde foi observada a ocorrência de trocas genéticas por meio de fusão nuclear com redução da ploidia e sem o envolvimento de processos meióticos, tal como ocorre em fungos (MISHRA; FORCHE; ANDERSON, 2021). A parassexualidade pode ser considerada uma via alternativa a recombinação meiótica, já que durante a fusão nuclear também pode ocorrer recombinação entre os genomas parentais, aumentando a diversidade da prole (FORCHE et al., 2008). Dentre os tripanossomátídeos, sabe-se que o parasito *Leishmania sp.*, apresenta um elevado grau de aneuploidia em seu genoma quando comparado a *T. brucei* e *T. cruzi* (SHAIK et al., 2021; STERKERS et al., 2011, 2014), o que pode dificultar a ocorrência de processos meióticos durante a recombinação nesse protozoário. Apesar de *Leishmania* possuir genes de meiose em seu genoma, o aumento em eventos de fusão observados nesse parasito quando submetido a estresse oxidativo e a formação de híbridos poliploides (LOURADO et al., 2022) sustentam eventos de parassexualidade nesse organismo. De forma diferente, o *T. brucei* se reproduz sexuadamente por meiose com ploidia estável (PEACOCK et al., 2011, 2014). No que se refere aos processos recombinacionais observados nos tripanossomátídeos, é possível que o parasito *T. cruzi*, possa ser uma forma intermediária entre *Leishmania* e *T. brucei*, apresentando tanto mecanismos de parassexualidade como de meiose, a depender das condições do ambiente.

O ensaio de fusão entre células Rad51+/- (Figura 28), apresentou baixos níveis de formação de híbridos (1,1%). Observação esta que não condiz com o fato da expressão gênica de DMC1 apresentar-se aumentada nestas células, como sugerido anteriormente. Se as células Rad51+/- podem aumentar a expressão de mRNA-DMC1 e o fato das células superexpressoras de DMC1 apresentarem uma elevada porcentagem de híbridos, o esperado seria encontrar uma formação de híbridos aumentada nas células deficientes para RAD51. No entanto, a possibilidade de aumento do transcrito de DMC1 em células Rad51+/- analisadas neste trabalho, pode não ter sido suficiente para induzir processos de fusão celular.

Além disso, vale ressaltar aqui, as diferenças entre as cepas utilizadas na construção dos parasitos modificados, sendo o superDMC1 construído na cepa não híbrida Dm28c e o Rad51+/- construído na cepa híbrida CL Brener. A forma distinta de regulação dos processos recombinacionais nessas cepas também pode estar interferindo nos mecanismos de fusão celular.

Como já foi visto em trabalhos anteriores do nosso grupo, cepas híbridas como CL Brener apresentam uma maior expressão de transcritos da HR, como RAD51 e BRCA2, do que cepas não híbridas (ALVES et al., 2018; RESENDE et al., 2020). O mesmo foi observado quando analisamos a expressão de mRNA-DMC1 nas cepas Dm28c e CL Brener, onde encontramos uma expressão de DMC1 aumentada na cepa CL Brener (Figura 20). O que suporta a nossa hipótese de que os níveis da recombinase meiótica DMC1 também devem estar mais elevados em cepas híbridas. Uma observação relevante a se fazer está no fato de não termos conseguido construir células superexpressando o gene DMC1 na cepa híbrida CL Brener, como já citado anteriormente, mesmo após várias tentativas, e termos conseguido por mais de uma vez construir células superexpressoras do gene RAD51 em CL Brener, ou seja, o fato das cepas de *T. cruzi* serem híbridas ou não também pode estar influenciando na regulação entre as recombinases da HR.

Ao examinarmos a cinética de formação de híbridos nas cepas Dm28c modificadas, foi possível constatar que os processos de fusão nas células que superexpressam DMC1, parece acontecer já na primeira hora de mistura (Figuras 29A e 30A). Células superDMC1 apresentaram uma elevada porcentagem de híbridos (18,12%) com apenas 1h de mistura, porcentagem esta que se manteve elevada também nos tempos de 6h (21,2%) e no tempo de 24h (18,3%) (Figura 30A), como já havia sido visto anteriormente. Essa taxa de formação de híbridos elevada já na primeira hora, evidencia a relação entre a recombinase DMC1 e o seu possível envolvimento em eventos de plasmogamia. Além disso, a formação de híbridos nessas células pode estar ocorrendo de forma quase que imediata, antes mesmo de 1h, como já observado em diferentes cepas selvagens onde a fusão citoplasmática parece ocorrer já nos primeiros 20 minutos de mistura (tese Resende, 2019).

Em *Trypanosoma brucei*, a reprodução sexuada meiótica começa quando células epimastigotas diploides aumentam a expressão dos seus genes de meiose, DMC1, HOP1 (equivalente a HOP2) e MND1 na meiose I e termina com a produção de gametas haploides (PEACOCK et al., 2011, 2014). Na tentativa de identificar os estágios intermediários de formação de gametas em *T. brucei*, foi visto que a proteína de fusão de membrana específica de gametas, HAP2, também tem sua expressão maximizada durante a meiose (PEACOCK et al., 2021). Proteína esta que recentemente também foi citada como sendo expressa em

células competentes ao acasalamento em *Leishmania*, sendo portanto considerada um marcador de células híbridas (LOURADOUR et al., 2021). HAP2 é homóloga a uma proteína de fusão encontrada em vírus, provavelmente surgiu no início da evolução dos eucariotos e é considerada uma proteína fundamental na fusão de membranas de células reprodutivas em diversos organismos como protistas, plantas e invertebrados (CLARK, 2018; FEDRY et al., 2018; ZHANG et al., 2021), sendo também encontrada e já caracterizada estruturalmente em *Trypanosoma cruzi* (FEDRY et al., 2018). Diante disto, e com base nos resultados de fusão citoplasmática encontrados em *T. cruzi* neste trabalho, podemos inferir que a expressão de DMC1 pode estar regulando a expressão de genes de fusão como HAP2 e até mesmo a formação de gametas nesse parasito, aumentando assim os eventos de fusão citoplasmática observados em células superDMC1.

Uma possível explicação para as diferenças visualizadas nos ensaios de hibridização com as células superDMC1 e superRAD51, pode estar no fato dessas recombinases apresentarem características de interação com a fita simples de DNA de forma divergente uma da outra. A recombinase DMC1 possui uma maior tolerância a mau pareamento de bases do que a RAD51 (LUO et al., 2021; STEINFELD et al., 2019) e isso provavelmente implica na formação de híbridos observados no parasito.

As proteínas da família RecA são recombinases que interagem diretamente com o ssDNA para formar os filamentos helicoidais e essa interação ocorre nos motivos de ligação ao DNA presentes nessas proteínas, conhecidos como Loop 1 de ligação ao DNA (L1) e Loop 2 de ligação ao DNA (L2) (CHEN; YANG; PAVLETICH, 2008). No trabalho de Steinfeld e colaboradores (2019), os autores identificaram resíduos de aminoácidos específicos e conservados nas regiões de loop de cada recombinase. Quando analisadas as sequências das recombinases de *Trypanosoma cruzi*, pôde-se observar que as regiões de ligação ao DNA (L1 e L2) apresentam a mesma conservação de aminoácidos encontrados em outros eucariotos como *S. cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Pneumocystis carinii*, *Oryza sativa*, *Mus musculus*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* e *Sus scrofa*. (Figura 34). Os modelos tridimensionais de DMC1 (Figura 36) e RAD51 (Figura 42) de *T. cruzi*, construídos neste trabalho, mostraram uma grande semelhança estrutural entre as proteínas do parasito e as de humanos, o que remete também a uma semelhança em suas funções biológicas.

Segundo retrata a literatura, um pequeno grupo de aminoácidos são os responsáveis por conferir uma maior estabilidade dos nucleofilamentos de DMC1 no heteroduplex de DNA (D-loop) durante a recombinação homóloga da meiose. Resíduos estes que interagem com a molécula de DNA de tal forma que proporcionam estabilidade da cadeia fosfato do DNA com DMC1 mesmo na presença de bases mal pareadas, as quais acabam distorcendo a estrutura

DMC1-ssDNA. Essa característica permite o pareamento entre DNA homólogos oriundos de diferentes parentais, o que possibilita a variabilidade genética e diversidade da prole, consequências diretas da meiose. De forma discrepante, a recombinase RAD51, não apresenta os mesmos aminoácidos nessas regiões de interação com a fita simples de DNA. O que confere a ela, uma menor estabilização dos possíveis *mismatches* e consequentemente, uma menor tolerância aos maus pareamentos de base. Sendo por isso a RAD51 utilizada majoritariamente na via de reparo HR, onde o reparo fiel é característico da via.

No trabalho de Luo e colaboradores (2021), os autores identificaram por meio da técnica de Cryo-EM e dinâmica molecular, os resíduos de aminoácidos que governam a fidelidade (tolerância a *mismatch*) das recombinases DMC1 e RAD51 em humanos. Foi apontado em DMC1 três resíduos (Q244, P274 e G275) responsáveis por interagirem diretamente com o DNA, de forma oposta aos resíduos encontrados em RAD51 nas posições equivalentes (M243 e V273 e D274). No nucleofilamento de DMC1, o resíduo Q244 (região L2) interage com o resíduo R242 (conservado entre as recombinases) proporcionando estabilidade a cadeia fosfato de DNA. O que segundo os autores não foi observado em RAD51 onde a M243 hidrofóbica causa uma interação mais fraca com a ssDNA, tendo sua cadeia lateral apontada para o lado oposto ao resíduo de arginina e a molécula de DNA. Essa relação enfraquecida de RAD51 com a cadeia fosfato de DNA nessa região seria uma das causas da recombinase não conseguir estabilizar bases mal pareadas durante a recombinação. Os outros dois resíduos encontrados em DMC1 e identificados como responsáveis pela tolerância ao *mismatch* são os resíduos de prolina (P274) e glicina (G275) encontrados na região L1, os quais a partir de interações com resíduos estruturalmente adjacentes (L236 e R239), proporcionam espaço e flexibilidade dentro do tripleto com presença de bases mal pareadas (LUO et al., 2021). Nessas posições, RAD51 apresenta os resíduos V273 e D274 que interagem de forma completamente diferente com os resíduos adjacentes na sua estrutura terciária (R235 e L238). Ao formar um “portão” hidrofóbico (V273:L238) e uma ponte salina (D274:R235) na região de interação com ssDNA, RAD51 é capaz de travar o pareamento de tripletos vizinhos na presença de bases mal pareadas, não sendo, portanto, tolerante a *mismatches* (LUO et al., 2021). Simulações de dinâmica molecular realizadas com mutantes de DMC1 e RAD51 evidenciaram o papel estrutural desses aminoácidos em sua tolerância ao *mismatch* durante eventos de recombinação, elucidando assim a nível de biologia estrutural quais seriam as razões moleculares para duas recombinases de mesma função atuarem em momentos tão distintos em eucariotos. Razões essas que talvez também podem ser aplicadas a *T. cruzi*, já que o parasita possui os mesmos resíduos específicos para TcDMC1 (Q162, P192 e G193) e TcRAD51 (M274, V304 e D305).

No ensaio de *docking* molecular com as recombinases do parasito foi possível perceber mais uma evidência dessa interação diferenciada de DMC1 e RAD51 com o ssDNA, em que a recombinase de meiose parece ter um ajuste mais flexível com a molécula de DNA apresentando apenas uma ligação de hidrogênio (Figura 48C) enquanto a recombinase da HR apresentou duas ligações de hidrogênio nas regiões de interação analisadas (Figura 49C). A diferença nas quantidades de ligações de hidrogênio encontradas em TcDMC1 e TcRAD51, pode evidenciar a forma distinta como essas recombinases interagem com a molécula de DNA durante a recombinação homóloga. É possível que a RAD51 de *Trypanosoma cruzi*, a qual apresenta uma ligação de hidrogênio a mais que DMC1, possua um “ajuste” mais fino com a cadeia fosfato do DNA, não permitindo as distorções estruturais provocadas por mau pareamento de bases. Por outro lado, TcDMC1 pode apresentar uma maior flexibilidade na sua interação com o DNA, admitindo assim a presença de *mismatches* e suas distorções a nível estrutural, tal como ocorre em humanos. Possibilidade esta que poderia ser testada através de ensaios de dinâmica molecular entre as recombinases de *T. cruzi* e DNA com bases mal pareadas. No entanto, os resultados de bioinformática estrutural com as recombinases TcDMC1 e TcRAD51 aqui apresentados, são suficientes para corroborar os resultados experimentais de hibridização citoplasmática observado em *T. cruzi*, onde misturas entre células superexpressoras do gene de meiose, DMC1, apresentaram uma elevada porcentagem de híbridos quando comparadas as células selvagens e superexpressoras de RAD51. Estes achados suportam a hipótese de tolerância a *mismatch* por DMC1 e o seu papel na recombinação meiótica em *Trypanosoma cruzi*.

6. CONCLUSÃO

Os dados observados neste trabalho nos fornecem evidências de que a recombinase DMC1 possa ter um papel ainda não descrito em *Trypanosoma cruzi*. O fato de DMC1 apresentar os resíduos de aminoácidos responsáveis pela tolerância ao *mismatch* e, suas distintas interações com a molécula de DNA encontradas no ensaio de *docking*, nos sugere um papel de atuação característico. Evidências da participação de DMC1 na regulação dos mecanismos de sinalização a DSBs e em eventos de formação de híbridos por fusão celular ou por trocas genéticas (figura F1 do apêndice), nos leva a acreditar que DMC1 de *T. cruzi* possui um papel específico em eventos de recombinação meiótica ou em eventos de recombinação com mau pareamento de bases. No entanto, para se ter mais clareza do papel de DMC1 nesses eventos de recombinação, mais experimentos necessitam ser realizados, a fim de responder perguntas tais como: em qual fase do ciclo de vida do parasito a proteína é mais expressa, qual a ploidia das células híbridas superexpressoras de DMC1, como está a cinética do ciclo celular nesses parasitos, quais outros genes de meiose estariam sendo regulados pela recombinase DMC1, dentre outros tantos questionamentos ainda a serem explorados

7. REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.
- AGRAWAL, A. F.; HADANY, L.; OTTO, S. P. The evolution of plastic recombination. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 803–812, 2005.
- AKERBLOM, L. et al. Overproduction of the free radical of ribonucleotide reductase in hydroxyurea-resistant mouse fibroblast 3T6 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 4, p. 2159–2163, 1981.
- AKOPYANTS, N. S. et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265–268, 2009.
- ALANI, E.; SUBBIAH, S.; KLECKNER, N. The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions. **Genetics**, v. 122, n. 1, p. 47–57, 1989.
- ALHMOUD, J. F. et al. DNA Damage / Repair Management in Cancers. **Cancers**, v. 12, n. 4, p.1050, 2020.
- ALVES, C. L. et al. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in Trypanosoma cruzi. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- AMBUR, O. H. et al. Steady at the wheel: Conservative sex and the benefits of bacterial transformation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1706, 2016.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7915–7922, 1993.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ARANA, M. E.; KUNKEL, T. A. Mutator phenotypes due to DNA replication infidelity. **Seminars**

in **Cancer Biology**, v. 20, n. 5, p. 304–311, 2010.

ASHUTOSH, T.; VYTAS, A. B. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. **Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications**, v. 2, n. 1, p. 1–19, 2018.

AWASTHI, P.; FOIANI, M.; KUMAR, A. ATM and ATR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 6, p. 1285, 2015.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, n. 6922, p. 499–506, 2003.

BATIPSTA, R. D. P. et al. Infection , Genetics and Evolution Evidence of substantial recombination among Trypanosoma cruzi II strains from Minas Gerais. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 183–191, 2014.

BEKKER, A. et al. Dating the Rise of Oxygen. **Nature**, v. 424, p. 117–120, 2004.

BELL, J. C.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 6, p. 491–507, 2016.

BERGERAT, A. et al. An atypical topoisomerase II from archea with implications for meiotic recombination. **Nature Communications**, v. 386, 1997.

BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.

BERNER, R. A. et al. Phanerozoic atmospheric oxygen. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 31, n. 1, p. 105–134, 2003.

BERNSTEIN, C.; JOHNS, V. Sexual reproduction as a response to H₂O₂ damage in Schizosaccharomyces pombe. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 4, p. 1893–1897, 1989.

BERNSTEIN, H. et al. Origin of Sex. p. 323–351, 1984.

BERNSTEIN, H.; BERNSTEIN, C.; MICHOD, R. E. DNA repair as the primary adaptive function of sex in bacteria and eukaryotes. In: DNA Repair: New Research. Editors: S. Kimura et al. **Nova Science Publishers** pp. 1-49, 2012.

BERNSTEIN, H.; BERNSTEIN, C.; MICHOD, R. E. Sex in microbial pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 8–25, 2017.

BERNSTEIN, H.; HOPF, F. A.; MICHOD, R. E. The evolution of sex: DNA repair hypothesis. In: Sociobiology of Reproduction, Strategies in Animal and Man. Editors: C. Vogel Rasa, E. Voland. **Publisher Chapman and Hall** , p. 3–18, 1989.

BERRY, A. S. F. et al. Sexual reproduction in a natural trypanosoma cruzi population. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. 1–17, 2019.

BHATTACHARYYA, M. K.; NORRIS, D. E.; KUMAR, N. Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: Implications for generating antigenic variation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 91–98, 2004.

BHATTI, S. et al. ATM protein kinase: The linchpin of cellular defenses to stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 18, p. 2977–3006, 2011.

BIANCO, P. R.; TRACY, R. B.; KOWALCZYKOWSK, S. C. DNA STRAND EXCHANGE PROTEINS: A BIOCHEMICAL AND PHYSICAL COMPARISON. **Molecular Cell**, v. 20, n. March, p. 783–792, 2005.

BISHOP, D. K. et al. DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. **Cell**, v. 69, n. 3, p. 439–456, 1992.

BIZARD, A. H.; HICKSON, I. D. The dissolution of double Holliday junctions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 7, p. 1–14, 2014.

BOOTH, W. et al. Facultative parthenogenesis discovered in wild vertebrates. **Biology Letters**, v. 8, n. 6, p. 983–985, 2012.

BOSCH, M. VAN DEN; BREE, R. T.; LOWNDES, N. F. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. **EMBO Reports**, v. 4, n. 9, 2003.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. **Annual review of microbiology**, v. 27, p. 347–382, 1973.

BRISSE, S. et al. Evidence for genetic exchange and hybridization in Trypanosoma cruzi based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n. 3, p. 173–183, 2003.

BROOKS CRICKARD, J. et al. Dynamic interactions of the homologous pairing 2 (Hop2)–meiotic nuclear divisions 1 (Mnd1) protein complex with meiotic presynaptic filaments in budding yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 2, p. 490–501, 2019.

BROWN, M. S.; BISHOP, D. K. DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–29, 2015.

BURMA, S. et al. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks . **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 276, n. 45, p. 42462–42467, 2001.

BUTTERFIELD, N. J. Bangiomorpha pubescens n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes . **Paleobiology**, v. 26, n. 3, p. 386–404, 2000.

BZYMEK, M. et al. Double holliday junctions are intermediates of DNA break repair. **Nature**, v. 464, n. 7290, p. 937–941, 2010.

CARLETTI, G.; NERVO, G.; CATTIVELLI, L. Flavonoids and melanins: A common strategy across two kingdoms. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1159–1170, 2014.

CARVER, J. H. Prebiotic atmosphere oxygen levels National Hydrology Conference. **Nature**, v. 292, p. 136-138, 1981.

CASADEI, D. Chagas' Disease and Solid Organ Transplantation The. **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 9, p. 3354–3359, 2010.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 203-266, 1998.

CHARLESWORTH, B. The evolution of sex and recombination. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 9, p. 264–267, 1989.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2014.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.

CHEN, J. et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. **Molecular Cell**, v. 2, n. 3, p. 317–328, 1998.

CHEN, J.; STUBBE, J. BLEOMYCINS: TOWARDS BETTER THERAPEUTICS. v. 5, n. February, p. 102–112, 2005.

CHEN, Z.; YANG, H.; PAVLETICH, N. P. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 489–494, 2008.

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

CLARK, T. HAP2/GCS1: Mounting evidence of our true biological EVE? **PLoS Biology**, v. 16, n. 8, p. 1–7, 2018.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic

transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, 2019.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.

COOPER, M. A. et al. Population Genetics Provides Evidence for Recombination in Giardia. **Current Biology**, v. 17, n. 22, p. 1984–1988, 2007.

CORTEZ, D. et al. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1162–1166, 1999.

COSTA-SILVA, H. M. Estudos dos mecanismos de sinalização e reparo do dano de DNA durante o estresse replicativo em *Trypanosoma cruzi*. 2019. 186 f. **Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo horizonte, 2019.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. review, p. 113–122, 2007.

COX, M. M. Relating biochemistry to biology: how the recombinational repair function of RecA protein is manifested in its molecular properties. **BioEssays**, n. 15, p. 617–622, 1993.

CRICKARD, J. B. et al. Spontaneous self-segregation of Rad51 and Dmc1 DNA recombinases within mixed recombinase filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 11, p. 4191–4200, 2018.

CRUZ-SAAVEDRA, L. et al. Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. **PeerJ**, v. 2020, n. 3, p. 1–26, 2020.

D'AMOURS, D.; JACKSON, S. P. The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 317–327, 2002.

DA SILVA, M. et al. Analysis of DNA Exchange Using Thymidine Analogs (ADEXTA) in *Trypanosoma cruzi*. **Bio-Protocol**, v. 8, n. 24, p. 1–18, 2018.

DA SILVA, R. B. et al. Selective human inhibitors of ATR and ATM render leishmania major promastigotes sensitive to oxidative damage. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–25, 2018.

DACKS, J.; ROGER, A. J. The first sexual lineage and the relevance of facultative sex. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 6, p. 779–783, 1999.

DALY, M. J. et al. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 1025–1028, 2004.

DALY, M. J. et al. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 10–15, 2010.

- DAROCHA, W. D. et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: Improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 113–120, 2004.
- DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 89–100, 2009.
- DE VRIES, S. J.; VAN DIJK, M.; BONVIN, A. M. J. J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 883–897, 2010.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 382–419, 2012.
- DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2005.
- DOMENICHINI, S. et al. Atmnd1- Δ 1 is sensitive to gamma-irradiation and defective in meiotic DNA repair. **DNA Repair**, v. 5, n. 4, p. 455–464, 2006.
- DOMINGUEZ, C.; BOELEN, R.; BONVIN, A. M. J. J. HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1731–1737, 2003.
- DOWNS, J. A.; LOWNDES, N. F.; JACKSON, S. P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. **Nature**, v. 408, n. 6815, p. 1001–1004, 2000.
- FEATHERSTONE, C.; JACKSON, S. P. DNA repair: The Nijmegen breakage syndrome protein. **Current Biology**, v. 8, n. 17, p. 622–625, 1998.
- FEDRY, J. et al. Evolutionary diversification of the HAP2 membrane insertion motifs to drive gamete fusion across eukaryotes. **PLoS Biology**, v. 16, n. 8, p. 1–26, 2018.
- FILIPPO, J. S. et al. Recombination Mediator and Rad51 Targeting Activities of a. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 17, p. 11649–11657, 2007.
- FORCHE, A. et al. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. **PLoS Biology**, v. 6, n. 5, p. 1084–1097, 2008.
- FOSTER, E. R.; DOWNS, J. A. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. **FEBS Journal**, v. 272, n. 13, p. 3231–3240, 2005.
- GATEI, M. et al. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. **Cancer Research**, v. 60, n. 12, p. 3299–3304, 2000.
- GAUNT, M. W. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v.

421, n. 6926, p. 936-939, 2003.

GIBSON, T. M. et al. Precise age of Bangiomorpha pubescens dates the origin of eukaryotic photosynthesis. **Geology**, v. 46, n. 2, p. 135–138, 2018.

GIBSON, W. et al. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. **Parasites and Vectors**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2008.

GIGLIA-MARI, G.; ZOTTER, A.; VERMEULEN, W. DNA damage response. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2011.

GLOVER, L.; HORN, D. Trypanosomal histone γ H2A and the DNA damage response. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 78–83, 2012.

GLOVER, L.; JUN, J.; HORN, D. Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 4, p. 1372–1380, 2011.

GLOVER, L.; MCCULLOCH, R.; HORN, D. Sequence homology and microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 8, p. 2608–2618, 2008.

GOHO, S.; BELL, G. Mild environmental stress elicits mutations affecting fitness in *Chlamydomonas*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1439, p. 123–129, 2000.

GOMES PASSOS SILVA, D. et al. The in vivo and in vitro roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1–25, 2018.

GOODARZI, A. A.; LEES-MILLER, S. P. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells. **DNA Repair**, v. 3, n. 7, p. 753–767, 2004.

GOODENOUGH, U.; HEITMAN, J. Origins of eukaryotic sexual reproduction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 3, p. 1–21, 2014.

GRAY, M. W. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. **Molecular Biology of the Cell**, v. 28, n. 10, p. 1285-1287, 2017.

GRELON, M. Mécanismes de la recombinaison méiotique. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 339, n. 7–8, p. 247–251, 2016.

HALL, B. G. Selection-induced mutations occur in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 10, p. 4300–4303, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2015.

HARTLERODE, A. J.; SCULLY, R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. **Biochemical Journal**, v. 423, n. 2, p. 157–168, 2009.

HEITMAN, J. Evolution of eukaryotic microbial pathogens via covert sexual reproduction. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 1, p. 86–99, 2010.

HENRY, J. M. et al. Mnd1/Hop2 Facilitates Dmc1-Dependent Interhomolog Crossover Formation in Meiosis of Budding Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 8, p. 2913–2923, 2006.

HESSEN, D. O. Solar radiation and the evolution of life. Solar Radiation and Human Health. In: Solar Radiation and Human Health. Editor: Espen Bjertness. **Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters**, p. 123–136, 2008.

HIDEG, É.; JANSEN, M. A. K.; STRID, Å. UV-B exposure, ROS, and stress: Inseparable companions or loosely linked associates? **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 2, p. 107–115, 2013.

HOEIJMAKERS, J. H. J. The consequences of DNA injury Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, 2001.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **The new england journal of medicine**, p. 1475–1485, 2009.

HOFSTATTER, P. G. et al. The Sexual Ancestor of all Eukaryotes: A Defense of the “Meiosis Toolkit”: A Rigorous Survey Supports the Obligate Link between Meiosis Machinery and Sexual Recombination. **BioEssays**, v. 2000037, p. 1–10, 2020.

HOFSTATTER, P. G.; LAHR, D. J. G. All Eukaryotes Are Sexual, unless Proven Otherwise: Many So-Called Asexuals Present Meiotic Machinery and Might Be Able to Have Sex. **BioEssays**, v. 41, n. 6, p. 1–9, 2019.

HOLLIDAY, R. the Induction of Mitotic Recombination By Mitomycin C in Ustilago and. **Genetics**, v. 50, p. 323–335, 1964.

HOLSINGER, K. E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7037–7042, 2000.

HONORATO, R. V. et al. Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. July, p. 1–7, 2021.

- HÖRANDL, E. Meiosis and the Paradox of Sex in Nature. **Intech**, p. 17-39, 2013.
- HÖRANDL, E.; HADACEK, F. The oxidative damage initiation hypothesis for meiosis. **Plant Reproduction**, v. 26, n. 4, p. 351–367, 2013.
- HÖRANDL, E.; HADACEK, F. Oxygen, life forms, and the evolution of sexes in multicellular eukaryotes. **Heredity**, v. 125, n. 1–2, p. 1–14, 2020.
- HÖRANDL, E.; SPEIJER, D. How oxygen gave rise to eukaryotic sex. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285: 20172706, 2018.
- HOWARD-TILL, R. A.; LUKASZEWICZ, A.; LOIDL, J. The recombinases Rad51 and Dmc1 play distinct roles in DNA break repair and recombination partner choice in the meiosis of Tetrahymena. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 3, 2011.
- JOAQUIN, A.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. Signalling DNA Damage. In: Protein Phosphorylation in Human Health, Editor: Cai Huang. **Intech Open**, 2012.
- JOHNSBORG, O.; ELDHOLM, V.; HÅVARSTEIN, L. S. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 10, p. 767–778, 2007.
- JUMANI, R. S. et al. A suite of phenotypic assays to ensure pipeline diversity when prioritizing drug-like Cryptosporidium growth inhibitors. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2019.
- KAVANAGH, J. N. et al. DSB Repair - A radiation perspective. **Antioxidants & Redox Signaling**, p. 1–41, 2012.
- KEENEY, S. Mechanism and Control of Meiotic Recombination Initiation. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 52, p. 1-53, 2001.
- KEENEY, S.; GIROUX, C. N.; KLECKNER, N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 375–384, 1997.
- KELSO, A. A. et al. Entamoeba histolytica Dmc1 catalyzes homologous DNA pairing and strand exchange that is stimulated by calcium and Hop2-Mnd1. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–27, 2015.
- KELSO, A. A. et al. Homologous recombination in protozoan parasites and recombinase inhibitors. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–11, 2017.
- KINEBUCHI, T. et al. Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the

human homologous-pairing protein Dmc1. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 363–374, 2004.

KINEBUCHI, T. et al. Role of the N-terminal domain of the human DMC1 protein in octamer formation and DNA binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28382–28387, 2005.

KIRK, D. L.; KIRK, M. M. Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. **Science**, v. 231, n. 4733, p. 51–54, 1986.

KLIMYUK, V. I.; JONES, J. D. G. AtDMC1, the Arabidopsis homologue of the yeast DMC1 gene: Characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. **Plant Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1997.

KOZLOV, S. V. et al. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. **EMBO Journal**, v. 25, n. 15, p. 3504–3514, 2006.

KOZLOV, S. V. et al. Autophosphorylation and ATM activation: Additional sites add to the complexity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9107–9119, 2011.

KRISKO, A.; RADMAN, M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14373–14377, 2010.

KROGH, B. O.; SYMINGTON, L. S. Recombination proteins in yeast. **Annual review of genetics**, v. 38, p. 233–271, 2004.

KUNG, E. J.; JURA, N. Structural basis for the non-catalytic functions of protein kinases. **Physiology & behavior**, v. 24, n. 1, p. 7–24, 2016.

LAHR, D. J. G. et al. The chastity of amoebae: Re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1715, p. 2081–2090, 2011.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LEE, J. H.; PAULL, T. T. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. **Oncogene**, v. 26, n. 56, p. 7741–7748, 2007.

LEE, J. Y. et al. Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases. **Science**, v. 349, n. 6251, p. 977–981, 2015.

LEHTONEN, J.; JENNIONS, M. D.; KOKKO, H. The many costs of sex. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 3, p. 172–178, 2012.

LIBERI, G.; FOIANI, M. The double life of Holliday junctions. **Cell Research**, v. 20, n. 6, p. 611–613, 2010.

LIN, Z. et al. Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10328–10333, 2006.

LIU, J. et al. Presynaptic filament dynamics in homologous recombination and DNA repair. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 240–270, 2011.

LÖBRICH, M. et al. γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. **Cell Cycle**, v. 9, n. 4, p. 662–669, 2010.

LONG, A.; MICHOD, R. E. Origin of sex for error repair I. Sex, diploidy, and haploidy. **Theoretical Population Biology**, v. 47, n. 1, p. 18-55, 1995.

LÓPEZ-GARCÍA, P.; MOREIRA, D. Open Questions on the Origin of Eukaryotes. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 30, n. 11, p. 697-708, 2015.

LÓPEZ-GARCÍA, P.; MOREIRA, D. The Syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited. **Nature Microbiology**, v. 5, n. May, p. 655-667, 2020.

LOURADOUR, I. et al. Stress conditions promote Leishmania hybridization in vitro marked by expression of the ancestral gamete fusogen HAP2 as revealed by singlecell RNA-seq. **eLife**, v. 11, p. 1–28, 2022.

LOURADOUR, II. et al. Stress conditions promote the mating competency of Leishmania promastigotes in vitro marked by expression of the ancestral gamete fusogen HAP2. **bioRxiv**, p. 12–26, 2021.

LUO, S. C. et al. Identification of fidelity-governing factors in human recombinases DMC1 and RAD51 from cryo-EM structures. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021.

MA, W. et al. Differential effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on DNA break repair in human cells are revealed with Epstein-Barr virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 17, p. 6590–6595, 2012.

MACLEOD, A. et al. Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: Proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 12–19, 2005.

MALIK, S. B. et al. Protist homologs of the meiotic Spo11 gene and topoisomerase VI reveal an evolutionary history of gene duplication and lineage-specific loss. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 12, p. 2827–2841, 2007.

MALIK, S. B. et al. An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.

MANNE-GOEHLER, J. et al. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 1–7, 2016.

MARGULIS, L. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 3, p. 1071-1076, 1996.

MARGULIS L; D., S. Origins of Sex: Three Billion Years of Genetic Recombination. [s.l.] **New Haven: Yale University Press**. pp. 259, 1986.

MARIN, P. A. et al. ATR Kinase Is a Crucial Player Mediating the DNA Damage Response in *Trypanosoma brucei*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. December, p. 1–18, 2020.

MASSIE, H. R.; SAMIS, H. V.; BAIRD, M. B. The kinetics of degradation of DNA and RNA by H₂O₂. **BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis**, v. 272, n. 4, p. 539–548, 1972.

MATSUMOTO, Y.; YOSHIDA, Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: Synaptonemal Complexes and Meiotic Nuclear Divisions Observed in Precysts. **The Journal of Protozoology**, v. 31, n. 3, p. 420–428, 1984.

MCGOWAN, C. H.; RUSSELL, P. The DNA damage response: Sensing and signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 629–633, 2004.

MCLLWRAITH, M. J. et al. Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. **Molecular Cell**, v. 20, n. 5, p. 783–792, 2005.

MEHTA, A.; HABER, J. E. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. **Cold Spring Harbor perspectives in Biology**, v. 6, n. 9, p. 1–17, 2014.

MICHOD, R.; LEVIN, B. The evolution of sex. Sunderland, Massachusetts: **Sinauer Associates Publishers**, 1988.

MIRZAGHADERI, G.; HÖRANDL, E. The evolution of meiotic sex and its alternatives. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1838, 2016.

MISHRA, A.; FORCHE, A.; ANDERSON, M. Z. Parasexuality of *Candida* Species. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, n. December, p. 796929, 2021.

- MITCHEL, K. et al. Molecular Structures of Crossover and Noncrossover Intermediates during Gap Repair in Yeast: Implications for Recombination. **Molecular Cell**, v. 38, n. 2, p. 211–222, 2010.
- MLAMBO, G.; COPPENS, I.; KUMAR, N. Aberrant Sporogonic Development of Dmc1 (a Meiotic Recombinase) Deficient Plasmodium berghei Parasites. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. **Methods in molecular biology**, v. 443, p. 365–382, 2008.
- NEALE, M. J.; PAN, J.; KEENEY, S. Endonucleolytic processing of covalent protein-linked double-strand breaks. **Nature**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2005.
- NEDELCO, A. M.; MICHOD, R. E. Sex as a response to oxidative stress: The effect of antioxidants on sexual induction in a facultatively sexual lineage. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. SUPPL. 2, p. 136–139, 2003.
- OCANA-MAYORGA, S. et al. Sex, subdivision, and domestic dispersal of Trypanosoma cruzi Lineage I in Southern Ecuador. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–8, 2010.
- OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROLSMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, 2000.
- OTTO, S. P. The evolutionary enigma of sex. **American Naturalist**, v. 174, n. SUPPL. 1, 2009.
- P. L. FOSTER. Mechanisms of stationary phase mutation: A decade of adaptive mutation. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 57–88, 1999.
- PAGE, S. L.; HAWLEY, R. S. Chromosome choreography: The meiotic ballet. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 785–789, 2003.
- PASSY, S. I. et al. Human Dmc1 protein binds DNA as an octameric ring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 19, p. 10684–10688, 1999.
- PAULL, T. T.; GELLERT, M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. **Molecular Cell**, v. 1, n. 7, p. 969–979, 1998.
- PAULL, T. T.; LEE, J. H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. **Cell Cycle**, v. 4, n. 6, p. 737–740, 2005.
- PEACOCK, L. et al. Identification of the meiotic life cycle stage of Trypanosoma brucei in the tsetse fly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3671–3676, 2011.

PEACOCK, L. et al. Meiosis and haploid gametes in the pathogen *Trypanosoma brucei*. **Current Biology**, v. 24, n. 2, p. 181–186, 2014.

PEACOCK, L. et al. Sequential production of gametes during meiosis in trypanosomes. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 2021.

PEZZA, R. J. et al. Molecular activities of meiosis-specific proteins Hop2, Mnd1, and the Hop2-Mnd1 complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18426–18434, 2006.

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

PIAZZA, A.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the formation of complex genomic rearrangements. **Physiology & behavior**, v. 29, n. 2, p. 135–149, 2019.

PITTMAN, D. L. et al. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. **Molecular Cell**, v. 1, n. 5, p. 697–705, 1998.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. **Journal of general microbiology**, v. 8, n. 1, p. 198–210, 1953.

PONTÉN, F. et al. A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 337, p. 1–9, 2009.

PROUDFOOT, C.; MCCULLOCH, R. *Trypanosoma brucei* DMC1 does not act in DNA recombination, repair or antigenic variation in bloodstream stage cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 245–253, 2006.

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 405, n. April, p. 391–405, 2010.

RAM, Y.; HADANY, L. Condition-dependent sex: Who does it, when and why? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1706, 2016.

RAMESH, M. A.; MALIK, S.-B.; AND JOHN M. LOGSDON, J. A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes: Evidence for Sex in *Giardia* and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. **Current Biology**, v. 15, p. 185–191, 2005.

RAMÍREZ, J. D. et al. Contemporary cryptic sexuality in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 17, p. 4216–4226, 2012.

REGIS-DA-SILVA, C. G. et al. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 191–200, 2006.

RESENDE, B. C. Influência da Recombinação nos Processos de Dormência e Hibridização em *Trypanosoma cruzi*. 2019. 163 f. **Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2019.

RESENDE, B. C. et al. The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–13, 2020.

ROTHSCHILD, L. J. The influence of UV radiation on protistan evolution. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 548–555, 1999.

ROZEWICKI, J. et al. MAFFT-DASH: Integrated protein sequence and structural alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W5–W10, 2019.

RUSMAN, F. et al. Evidence of hybridization, mitochondrial introgression and biparental inheritance of the kDNA minicircles in *trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2020.

SAGAN, D.; MARGULIS, L. Cannibal's relief: the origins of sex. **New Scientist**, v. 115, n. 1572, p. 36–40, 1987.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, 1993.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 229–257, 2008.

SARTORI, A. A. et al. Europe PMC Funders Group Human CtIP promotes DNA end resection. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 509–514, 2008.

SCHURKO, A. M.; LOGSDON, J. M.; EADS, B. D. Meiosis genes in *Daphnia pulex* and the role of parthenogenesis in genome evolution. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–27, 2009.

SCHWABL, P. et al. Meiotic sex in Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

SEHORN, M. G. et al. Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 433–437, 2004.

SEITZ, E. M.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. The DNA binding and pairing preferences of the archaeal RadA protein demonstrate a universal characteristic of DNA strand exchange proteins. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 555–560, 2000.

SHAIK, J. S. et al. Leishmania sexual reproductive strategies as resolved through computational methods designed for aneuploid genomes. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2021.

SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, 2006.

SHORT, J. M. et al. High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 19, p. 9017–9030, 2016.

SILVA, G. L. A. et al. Unpicking the Roles of DNA Damage Protein Kinases in Trypanosomatids. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. August, p. 1–12, 2021.

SINGH, A.; XU, Y. J. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. **Genes**, v. 7, n. 11, 2016.

SPANG, A. et al. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. **Nature**, v. 521, n. 7551, p. 173–179, 2015.

SPEIJER, D.; LUKEŠ, J.; ELIÁŠ, M. Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 29, p. 8827–8834, 2015.

STASSEN, N. Y. et al. Isolation and characterization of rad51 orthologs from *Coprinus cinereus* and *Lycopersicon esculentum*, and phylogenetic analysis of eukaryotic recA homologs. **Current genetics**, v. 31, n. 2, p. 144–157, 1997.

STEINFELD, J. B. et al. Defining the influence of Rad51 and Dmc1 lineage-specific amino acids on genetic recombination. **Genes & Development**, v. 33, n. 17–18, p. 1191–1207, 2019.

STERKERS, Y. et al. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 274–283, 2011.

STERKERS, Y. et al. Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: Alternative genetics. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 429–435, 2014.

STORY, R.; WEBER, I.; STEITZ, T. The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer. **Nature**, v. 355, p. 318–325, 1992.

STURM, N. R. et al. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 269–279, 2003.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 35–43, 2010.

SUN, Y. et al. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1376–1382, 2009.

SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of homologous recombination: Mediators and helicases take on regulatory functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 10, p. 739–750, 2006.

SUOMALAINEN, E. Significance of Parthenogenesis in the Evolution of Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 7, n. 1, p. 349–366, 1962.

SUWAKI, N.; KLARE, K.; TAROUNAS, M. RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 8, p. 898–905, 2011.

SYMINGTON, L. S. Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 630–670, 2002.

SYMINGTON, L. S. End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2014.

TABBABI, A. et al. Nuclear and kinetoplast dna analyses reveal genetically complex leishmania strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Peru. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1–14, 2020.

TELITTCHENKO, R.; DESCOTEAUX, A. Study on the Occurrence of Genetic Exchange Among Parasites of the *Leishmania mexicana* Complex. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–11, 2020.

TIBAYRENC, M. et al. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115–119, 1986.

TIBAYRENC, M. et al. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5129–5133, 1991.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Reproductive clonality of pathogens: A perspective on

pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 48, 2012.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. How clonal are Trypanosoma and Leishmania? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 264–269, 2013.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. A misleading description of the predominant clonal evolution model in Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, v. 187, p. 13–14, 2018.

TRUJILLO, K. M. et al. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34, p. 21447–21450, 1998.

TSUBOUCHI, H. et al. Two auxiliary factors promote Dmc1-driven DNA strand exchange via stepwise mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 22, 2020.

TSUBOUCHI, H.; ROEDER, G. S. Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired. **Genes and Development**, v. 20, n. 13, p. 1766–1775, 2006.

VILENCHIK, M. M.; KNUDSON, A. G. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12871–12876, 2003.

VILLENEUVE, A. M.; HILLERS, K. J. Whence meiosis? **Cell**, v. 106, n. 6, p. 647–650, 2001.

VIOTTI, R. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 151–162, 1994.

VÍTOR, A. C. et al. Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. February, p. 1–16, 2020.

WALLACE, P. K. et al. Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: Monitoring proliferation by dye dilution. **Cytometry Part A**, v. 73, n. 11, p. 1019–1034, 2008.

WARD, J. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. **International Journal of Radiation Biology**, v. 66, n. 05, p. 427–432, 1994.

WEEDALL, G. D.; HALL, N. Sexual reproduction and genetic exchange in parasitic protists. **Parasitology**, v. 142, p. S120–S127, 2014.

WEITERING, T. J. et al. ATM: Translating the DNA Damage Response to Adaptive Immunity.

Trends in Immunology, v. 42, n. 4, p. 350–365, 2021.

WESTENBERGER, S. J. et al. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 527–543, 2005.

WHO. Chagas disease (American Trypanosomiasis). **World Health Organization**, 2020.

WILLIAMS, R. M.; ZHANG, X. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 163, p. 109–119, 2021.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

WOLFFE, A. P.; HAYES, J. J. Chromatin disruption and modification. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 3, p. 711–720, 1999.

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10524–10535, 2018.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, p. 1580–1594, 2006.

XU, B. et al. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. **Cancer Research**, v. 62, n. 16, p. 4588–4591, 2002.

XU, J. et al. Cryo-EM structures of human recombinase RAD51 filaments in the catalysis of DNA strand exchange Jingfei. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 24, n. 1, p. 40–46, 2017.

YANG, S. et al. Archaeal RadA protein binds DNA as both helical filaments and octameric rings. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, n. 5, p. 1077–1085, 2001.

ZHANG, F. et al. PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. **Current Biology**, v. 19, n. 6, p. 524–529, 2009.

ZHANG, J. et al. Species-specific gamete recognition initiates fusion-driving trimer formation by conserved fusogen HAP2. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021.

ZHONG, Q. et al. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 747–750, 1999.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature:

second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Corrosion and Protection**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

8. APÊNDICES

8.1. APÊNDICE A - Confirmação de células ATM+/- por sequenciamento de genoma completo de *T. cruzi*.

A fim de confirmar a depleção do domínio cinase de ATM em células de *Trypanosoma cruzi* ATM+/- utilizadas neste trabalho, foi realizado um sequenciamento de genoma completo (WGS) de dois isolados de ATM+/- construídos na cepa CL Brener. Como é possível observar na figura abaixo, a região gênica referente ao domínio cinase de ATM destacada em preto apresenta uma porcentagem de cobertura (quantidade de reads) com valor equivalente à metade da região gênica não alterada, destacada em vermelho. Os valores de cobertura e suas porcentagens são melhor visualizados na tabela A1, sendo ATM1 e ATM2 referentes aos dois isolados que foram sequenciados.

Após mapeamento contra o genoma de CL Brener Não Esmeraldo, a cobertura em cada posição do cromossomo 1 foi estimada utilizando a ferramenta Depth do pacote SAMtools. As médias foram calculadas utilizando o software R.

Tabela A1 – Heminocaute parcial do gene ATM confirmado por médias de cobertura do sequenciamento de genoma completo (WGS). A cobertura média da região heminocaute foi de aproximadamente 50% da cobertura média das regiões não heminocaute em ATM1 e em ATM2.

	ATM1	ATM2
Chr1 AVG Hemi Coverage	43.37123	78.56036
Chr1 AVG Non-Hemi Coverage	88.77158	144.608
AVG Hemi / AVG Non-Hemi	48.9%	54.3%

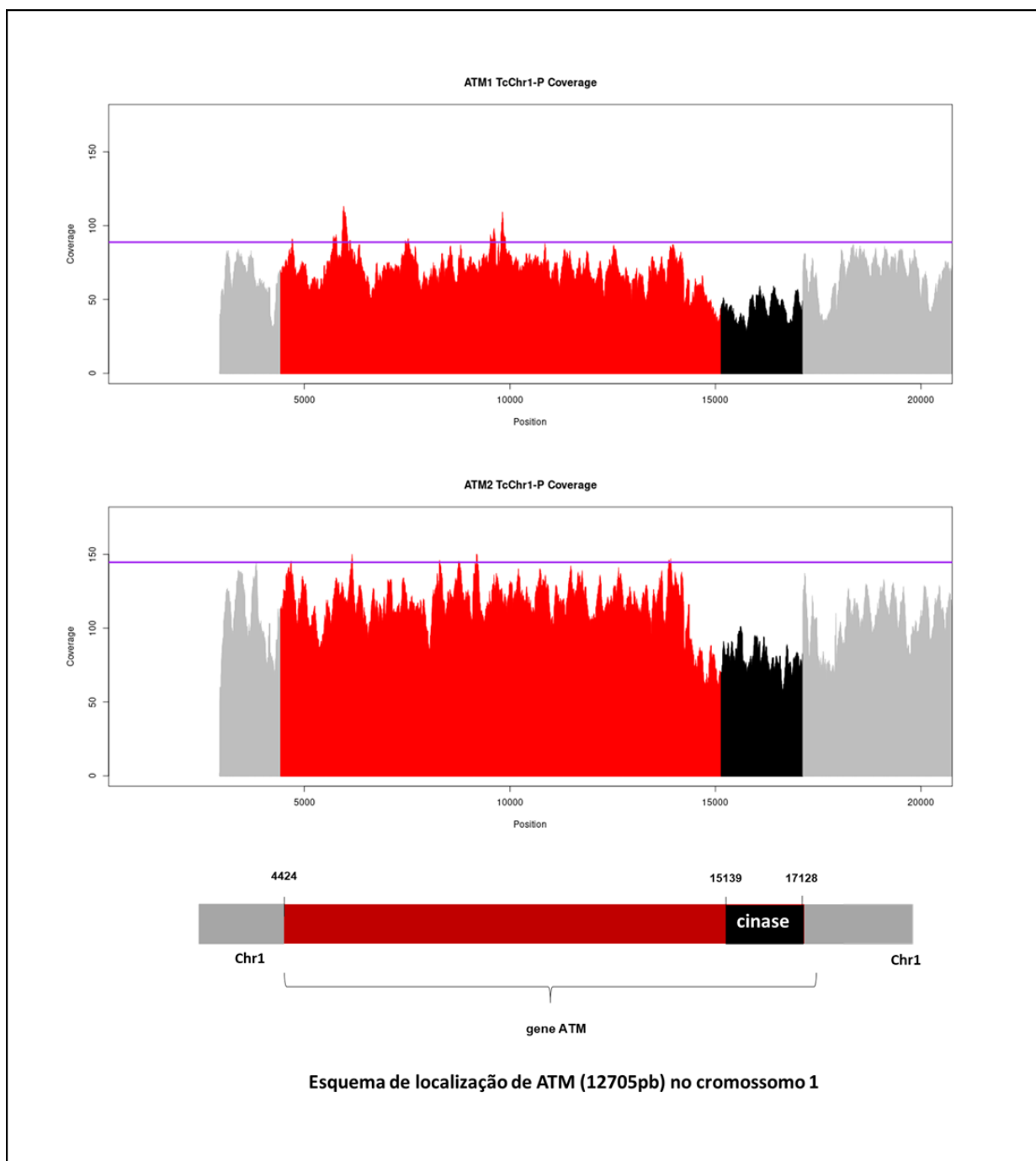


Figura A1 – Heminocaute parcial do gene ATM visualizado por sequenciamento de genoma completo (WGS). A figura representa a porção do cromossomo 1 de CL Brener Não Esmeraldo que contém o gene ATM (destacado em vermelho e preto). ATM1 e ATM2 representam os diferentes isolados que foram sequenciados. Para cada um deles, o gráfico mostra a cobertura (quantidade de reads) em cada posição do cromossomo. A região do gene deletada no alelo Não Esmeraldo (destacada em preto) apresenta cobertura média igual a aproximadamente 50% da cobertura média das regiões não modificadas. A cobertura média está representada pela linha roxa. Na parte inferior da figura, tem-se o esquema de localização do gene ATM no cromossomo 1, com destaque para a região referente ao domínio cinase.

8.2. APÊNDICE B - Células ATM+/- tratadas com MMS e analisadas em 24h e 48h

Além das curvas de sobrevivência com MMS por tempo prolongado (5 dias), também foram realizados três ensaios adicionais com as células WT CL Brener e ATM heminocautes tratadas com MMS (1,5mM) e analisadas 24h e 48h depois, como visto na figura abaixo. Onde em todas foi possível perceber a sensibilidade das células ATM +/- e a parada de crescimento já nos primeiros dias. Também foi realizado um ensaio de γ H2A em células tratadas com MMS, evidenciando a presença de DSB mesmo após 48h em ATM+/- diferente do observado em CL Brener.

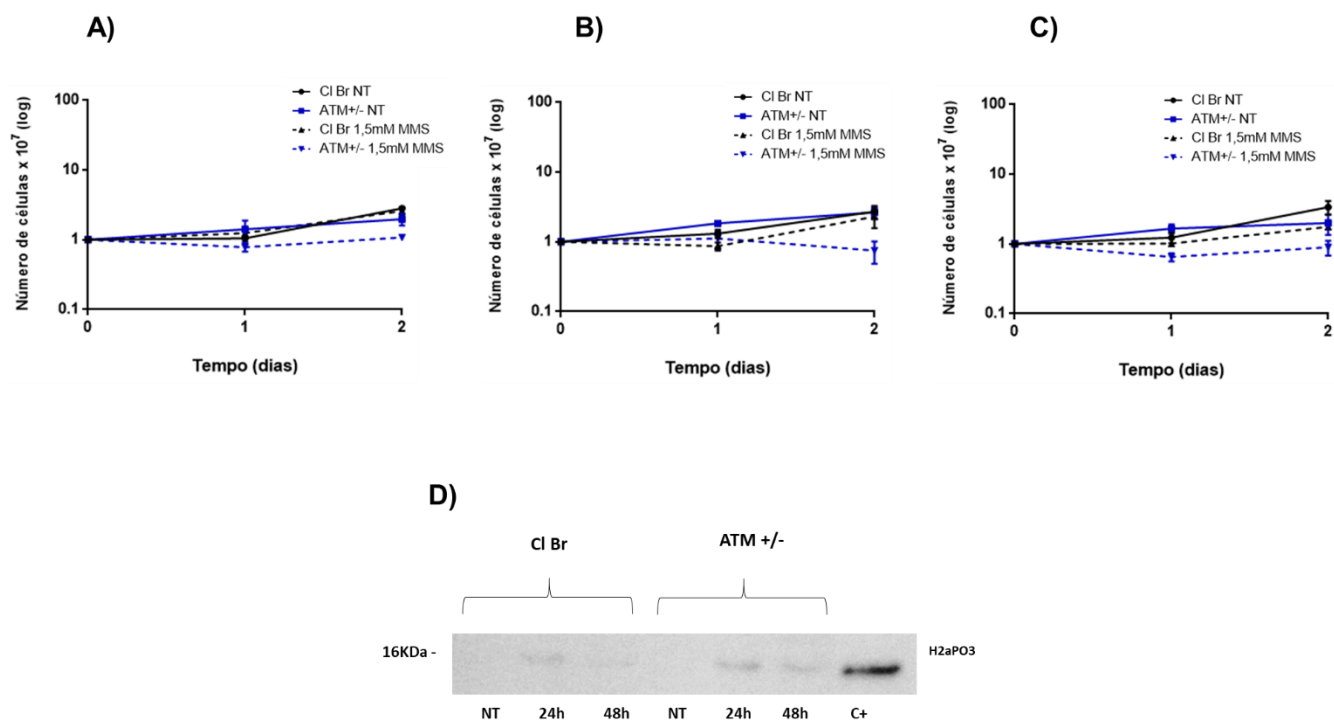


Figura B1 – Curvas de sobrevivência das células ATM +/- tratadas com MMS nos tempos de 24 e 48h (A, B e C) e análise de γ H2A (D) com ATM+/- apresentando marcação mesmo após 48h.

8.3. APÊNDICE C - Imagens dos híbridos superDMC1 x superDMC1

Já nos primeiros experimentos de fusão celular com as células superexpressoras de DMC1, foi possível observar células híbridas duplamente marcadas, coradas em amarelo, como apontadas por setas nas imagens abaixo. Em raros momentos foram vistas células híbridas com o formato celular diferenciado como visto na figura C1 (C) e com uma marcação de DNA e citoplasma aparentemente atípicos como mostrado em C1 (B) no campo claro e em DAPI.

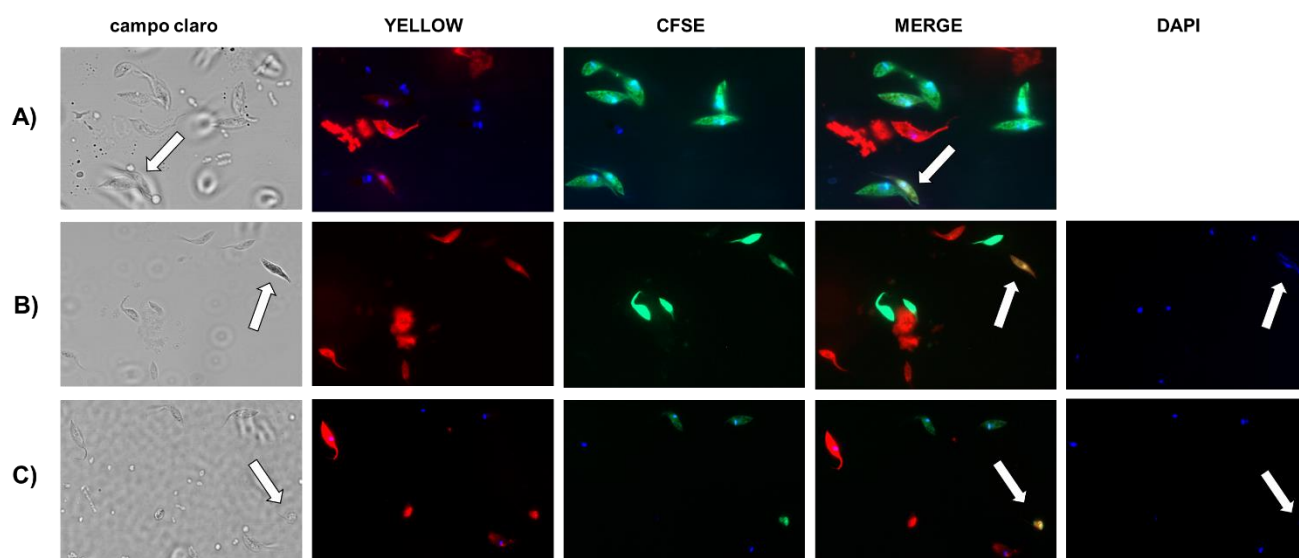


Figura C1 – imagens de células híbridas encontradas em misturas de superDMC1 x superDMC1 após 24h. Híbridos destacados por setas brancas nas imagens do campo claro e MERGE.

Na figura B2, tem-se uma observação mais clara quanto ao formato celular do *T.cruzi* superexpressor de DMC1. Com formato do corpo diferente do esperado para um epimastigota, uma célula híbrida foi observada e analisada por imagens ampliadas nos campos claro, sem marcação e nos campos fluorescente para o CellTrace e DAPI, com visto na figura C2 (B). Em C2 (C) tem-se o campo analisado com todas as células coradas sob a perspectiva do eixo tridimensional Z, com destaque para a célula híbrida apontada pela seta branca.

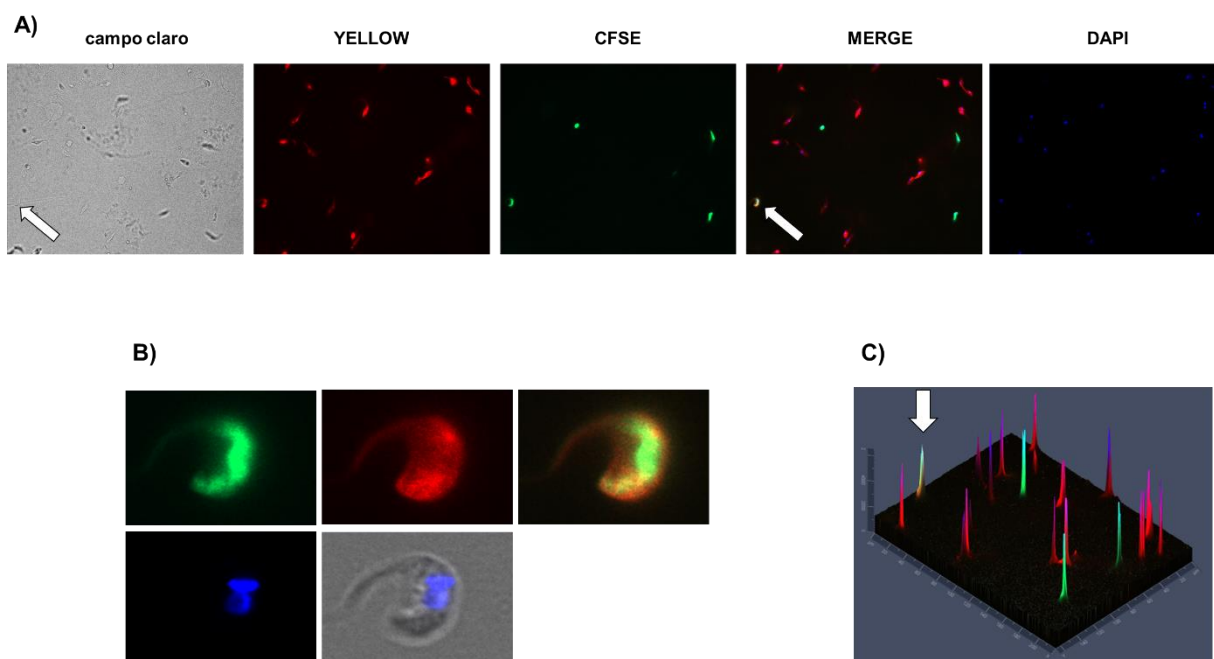


Figura C2 – Destaque para célula híbrida de superDMC1. **A:** Formato celular diferenciado observado nos campos claro, YELLOW, CFSE e MERGE. Híbrido apontado por seta branca. **B:** Imagens ampliadas do híbrido visualizado na letra A em todos os campos analisados. **C:** Imagem do eixo Z, evidenciando a célula híbrida duplamente marcada.

8.4. APÊNDICE D - Identidade da proteína TcDMC1 por espectrometria de massa

Em anos anteriores a elaboração desta tese, algumas proteínas de *T. cruzi* foram expressas e purificadas em diferentes sistemas heterólogos. A proteína DMC1 de *Trypanosoma cruzi* foi expressa na cepa de E.coli ArticExpress (Agilent Technologies) sendo melhor visualizada na fração insolúvel do extrato. Durante a purificação a proteína foi submetida a cromatografia em coluna de afinidade HisTrap™ HP de 5 mL (GE Healthcare Life Science), onde foi purificada de forma parcial. Diferentes frações contendo a banda de tamanho esperado (37KDa) foram agrupadas em um pool, onde a posteriori foram novamente purificadas e analisadas em gel SDS-PAGE. Com o intuito de obter anticorpos policlonais específicos para DMC1 de *T. cruzi*, a proteína purificada foi então utilizada em ensaios de imunização de camundongos da linhagem Balb/c. Após protocolo de imunização, o soro sanguíneo dos animais contendo os anticorpos anti-DMC1 foram utilizados em ensaios de western blot e imunofluorescência.

Após alguns experimentos de western blot apresentarem marcação para a proteína TcDMC1 em tamanhos não esperados, tanto para a proteína purificada quanto para extratos totais de CL Brener, como visualizados na figura D1 (A), foi realizada então uma análise por espectrometria de massa, para uma melhor identificação da proteína. Três bandas referentes a proteína TcDMC1 foram purificadas de gel SDS-PAGE e analisadas por sequenciamento de peptídeos (MS/MS) no Espectrômetro de Massa MALDI-TOF-TOF Ultraflex III, o qual caracteriza moléculas pela medida da relação massa/carga dos seus íons. Como resultado do sequenciamento, identificou-se que as bandas referentes a proteína TcDMC1 analisadas não eram da proteína DMC1 de *Trypanosoma cruzi*, e sim de uma chaperona molecular de bactéria (Cpn60). Na figura D1 (C) é possível observar um dos peptídeos sequenciados na proteína TcDMC1 e que está presente na sequência proteica da *Oleispira antartica*. Como a bactéria ArticExpress foi utilizada como sistema de expressão da proteína DMC1, acredita-se que durante as etapas de purificação, a Cpn60 da Artic tenha sido eluída no lugar da DMC1 de *T.cruzi*, não sendo possível assim dar continuidade aos ensaios com os anticorpos gerados. A partir desses resultados, partiu-se então para novas tentativas de clonagem e expressão de TcDMC1 em bactérias.

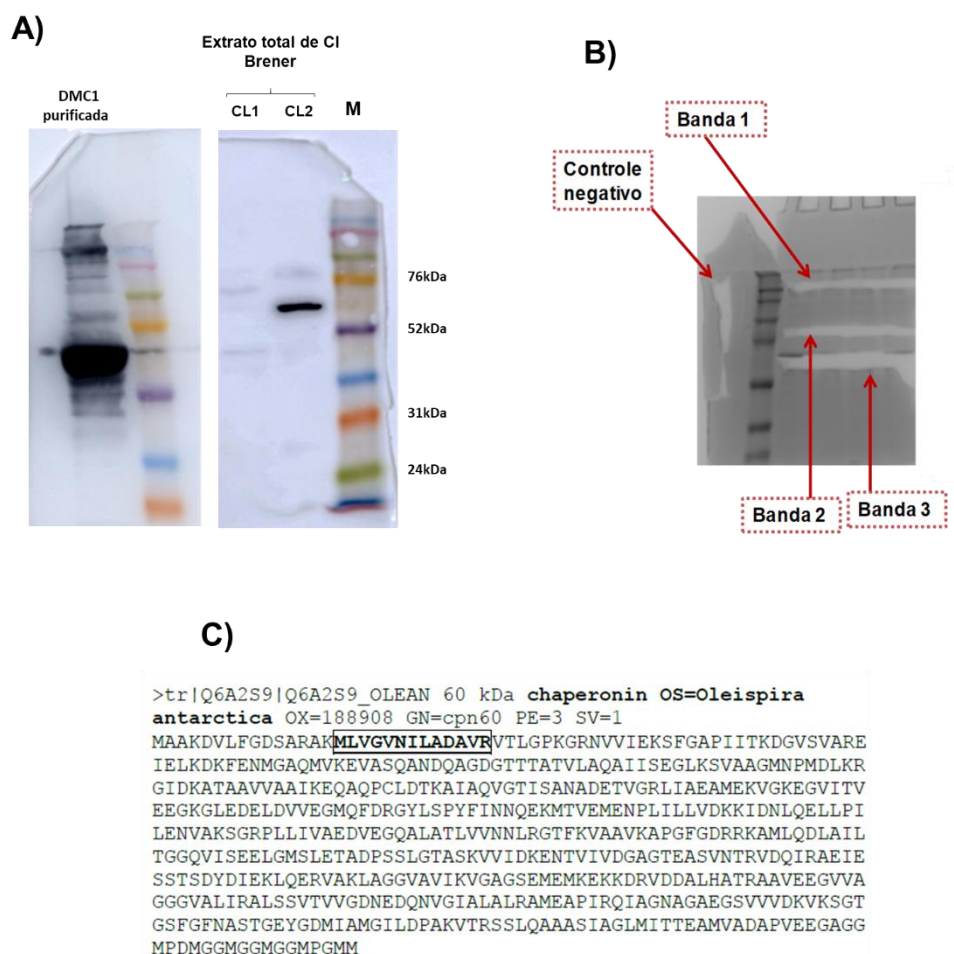


Figura D1 – Análises da proteína TcDMC1 utilizada na produção de anticorpos anti-DMC1. A: Western blot para a proteína purificada utilizada nos ensaios de imunização (DMC1 purificada) e para os extratos proteicos da cepa CL Brener em fase estacionária (CL1) e em fase de crescimento exponencial (CL2), com banda de tamanho entre 52kDa e 76kDa. **B:** Representação das 3 bandas purificadas do gel SDS-PAGE de TcDMC1, que foram analisadas por MS/MS. **C:** Destaque para peptídeo sequenciado oriundo da proteína TcDMC1, sem *hit* com DMC1 de *T.cruzi* e encontrada na bactéria *Oleispira antarctica*.

8.5. APÊNDICE E - Tentativa de clonagem DMC1 no pET28aTEV

A fim de expressar a proteína DMC1 de *T. cruzi* em bactéria, foram realizadas algumas tentativas de clonagem no vetor de expressão pET28aTEV, o qual foi Modificado no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME, Campinas/SP) (CARNEIRO et al., 2006) a partir do vetor pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha).

Os iniciadores utilizados (DMC1 Fw Nde1: 5'TCG ACA TAT GCA GCA CGC AGG CAC ACG 3' e o DMC1 Rv Xho1: 5'TAC ACT CGA GCT ACT CAC GTG CAT CAA CGA TGC 3') para a clonagem do gene DMC1 (1056pb) no vetor de expressão pET28aTEV (5357pb) foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas Nde1 (CATATG) e Xho1 (CTCGAG), que não clivam a sequência a de DMC1 e possibilitam a clonagem do inserto logo após o sítio para a TEV protease e antes da cauda de histidina C-terminal, conforme visualizado no mapa do vetor (anexo 2).

Inicialmente foram realizadas reações de PCR para amplificação e purificação do inserto de DMC1 e reações teste de digestão dupla do vetor com as enzimas Nde1 e Xho1, como visto na figura abaixo.

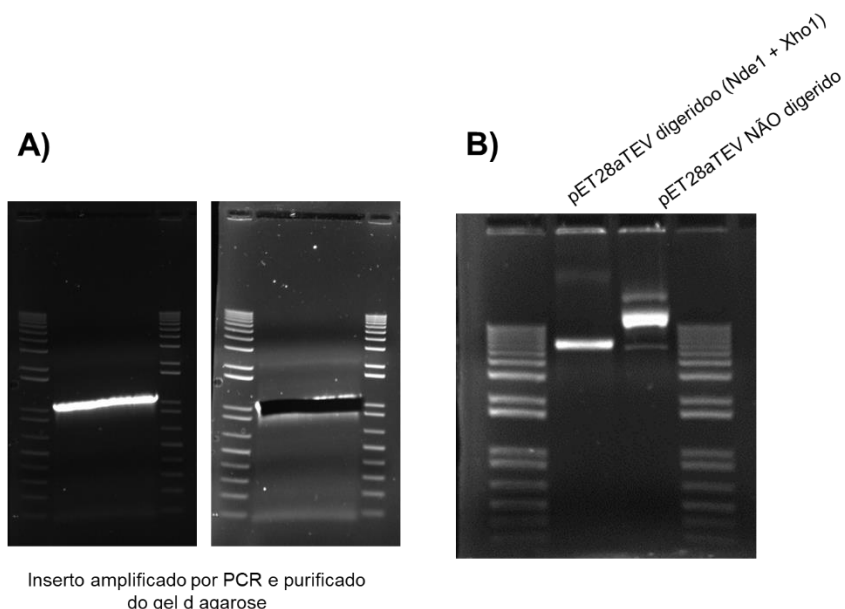


Figura E1 – Preparo do inserto e teste e digestão teste do vetor de expressão. A: Fragmento de DMC1 (1056pb) amplificado por reação de PCR e cortado do gel de agarose para posterior purificação.

B: Teste de digestão dupla do vetor de expressão pET28aTEV, mostrando o vetor digerido com as enzimas Nde1 e Xho1 e o vetor não digerido.

A fim de testar a eficiência das enzimas de restrição utilizadas, foram feitas reações de digestão com as enzimas separadas, usando uma de cada vez e em diferentes vetores, onde após testar várias condições da reação (unidade de enzima utilizada, tampão, tempo e temperatura da digestão), foi observado que a enzima Xho1 utilizada nos testes iniciais não estava funcionando adequadamente (figura E2 (B)). Após verificar a eficiência de uma outra enzima Xho1, como visto na figura E2 (C), os ensaios de digestão do vetor e do inserto foram continuados.

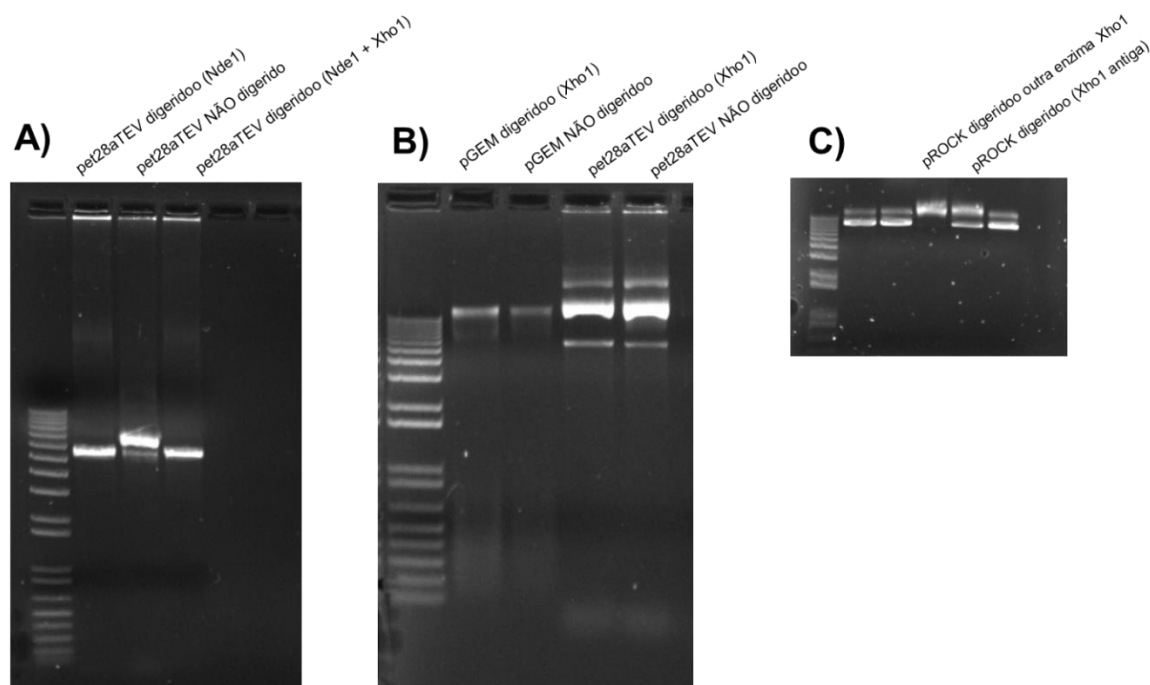


Figura E2 – Teste das enzimas de restrição utilizadas. **A:** Reações de digestão do vetor apenas com a enzima Nde1 e com as duas enzimas Nde 1 Xho1, não apresentando diferenças no padrão de digestão. **B:** Teste d enzima Xho1 em diferentes vetores (vetor pGEM e vetor pET28aTEV) a fim de linearizá-los, não sendo possível observar diferenças no padrão de digestão quando comparados aos vetores não digeridos. **C:** teste de uma outra enzima Xho1 disponível no laboratório, mostrando diferença no padrão de digestão do vetor pROCK utilizado no teste.

Após confirmação da funcionalidade da nova enzima Xho1 nas reações de digestão do pET28aTEV, o inserto e o vetor foram digeridos de forma adequada como visualizados em gel (figura E3 (A e B)). Durante as tentativas de clonagens, inicialmente foi realizada uma reação de ligação na proporção 1:1 de inserto: vetor, onde a partir dessa ligação obteve-se

em placa apenas uma colônia positiva, confirmada por PCR por uma banda fraca no tamanho de 1056 pb, confirmando a presença do inserto DMC1. Clone esse que não foi mais possível ser confirmado na PCR da placa réplica, como observada na figura E3 (C e D).

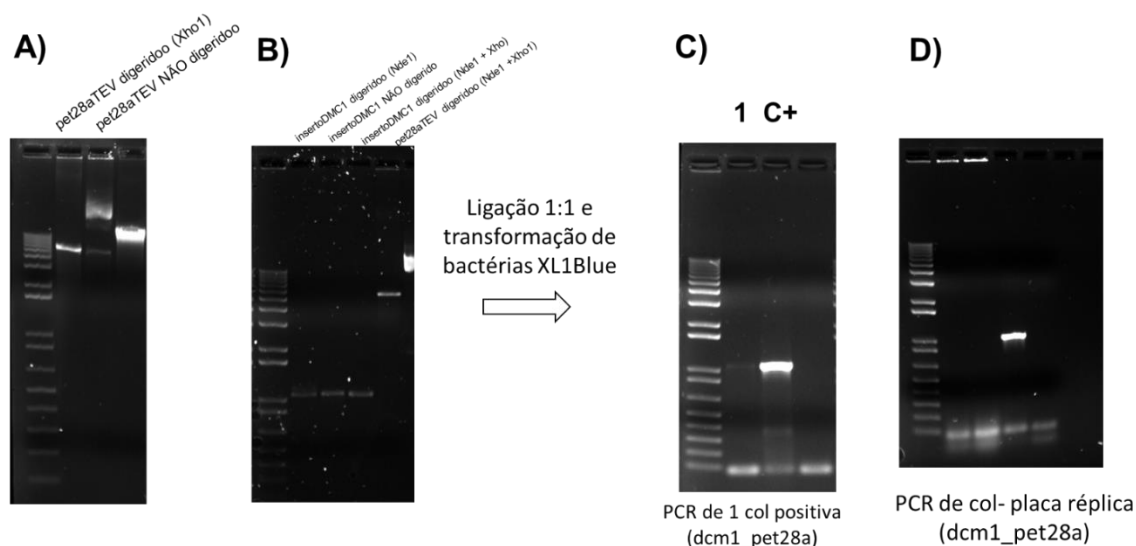


Figura E3 – Esquema de obtenção de clone positivo. **A:** vetor de expressão devidamente digerido com a nova enzima Xho1 utilizada. **B:** inserto e vetor digeridos com Nde1 e Xho1. **C:** PCR da única colônia crescida em placa, com uma aplicação bem fraca para DMC1 (1). **D:** PCR da placa réplica, mostrando ausência de amplificação para o inserto.

Após novas tentativas de clonagens, o inserto e o vetor digeridos e purificados, foram utilizados em reações de ligação com proporção de 3:1, onde dessa vez após transformação de bactérias eletrocompetentes da linhagem XL1Blue foi possível obter 7 clones positivos em placa (com antibiótico de seleção canamicina), confirmados por PCR. Mais uma vez os clones positivos quando passados para uma placa réplica não foram mais confirmados por PCR, não sendo possível observar nenhuma amplificação (figura E4).

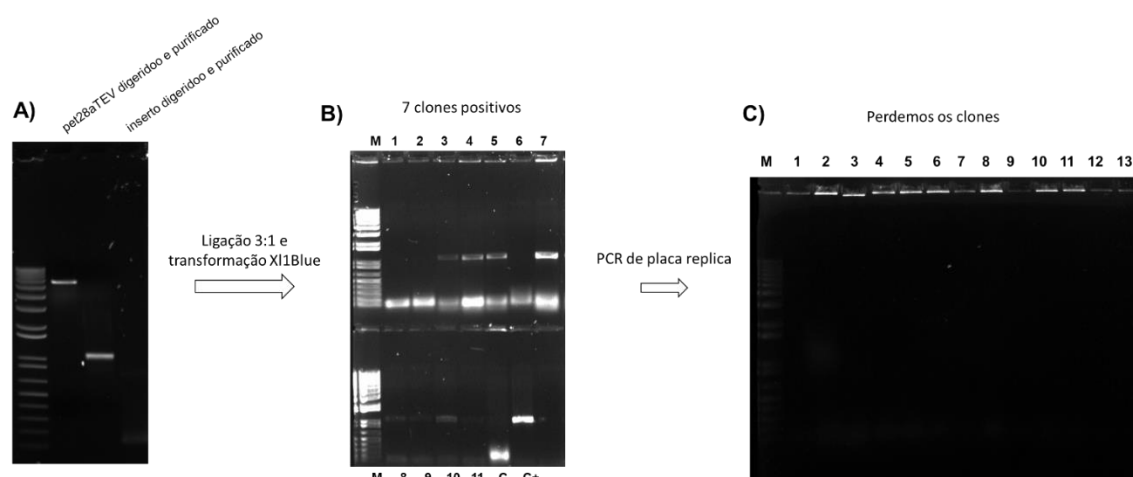


Figura E4 – Obtenção de clones positivos – **A:** inserto e vetor devidamente digeridos e purificados. **B:** PCR de 11 colônias crescidas em placa, após transformação de bactérias da cepa XL1Blue, onde é possível visualizar 7 clones positivos para o inserto DMC1. **C:** PCR negativa da placa réplica referente aos clones positivos, não sendo possível a confirmação nessa placa.

Ainda na tentativa de obter clone positivos para *dmc1_pET28aTEV*, novas transformações foram realizadas dessa vez em outra cepa de bactéria (DH5a), onde foi possível confirmar a presença de mais 2 clones positivos para DMC1 (figura E5 (A)). Mesmo com os resultados da placa réplica dando negativo para as colônias crescidas, realizou-se o inóculo de alguns clones positivos da placa mãe para posterior extração de DNA plasmidial. Inicialmente 4 clones foram escolhidos e testados, não sendo possível confirmar a presença do inserto nesses plasmídeos (figura E5(B)). Mesmo com resultados negativos, ainda assim foi realizada uma análise de restrição dos plasmídeos de 6 clones positivos (3,4,5,6,4* e 5*), utilizando as enzimas Xba e Xho, com o objetivo de liberar um inserto de 1225pb (1056pb de DMC1 + 169pb do vetor). Como resultado, não foi possível observar a presença de DMC1 na construção do plasmídeo *dmc1_pET28aTEV*. A fim de confirmar de fato a não inserção de DMC1 no vetor de expressão, dois clones foram selecionados (7 e 5 *) para sequenciamento do DNA utilizando os primers universais T7F e T7R. No sequenciamento analisado, os *contigs* não apresentaram a sequência gênica de DMC1 no vetor *pET28aTEV*, confirmando assim a ausência de clones positivos.

Diante do insucesso nas tentativas de clonagem e do prazo para o término da tese, partiu-se então para a abordagem *in silico* de modelagem comparativa.

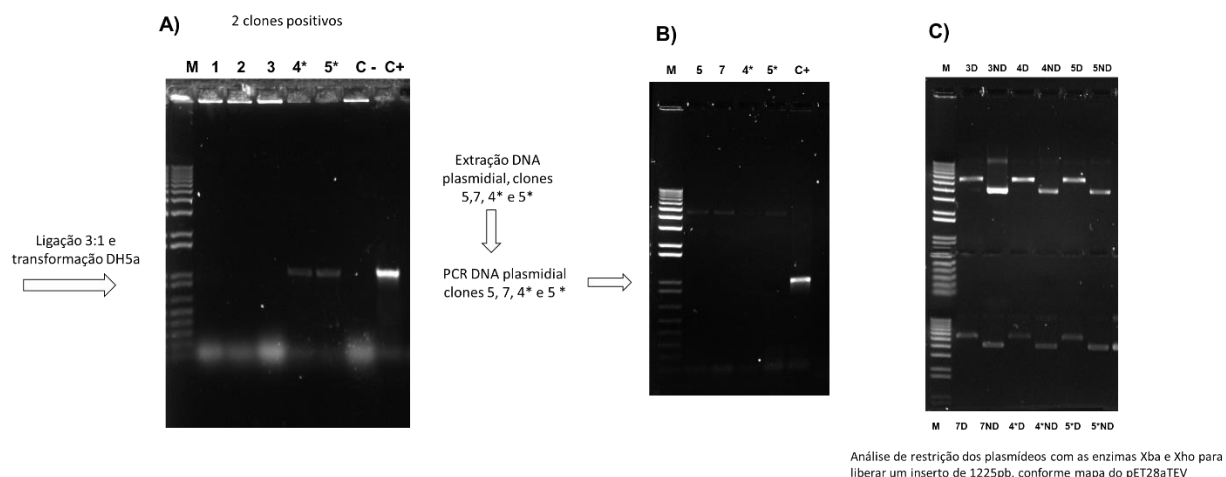


Figura E5 – Obtenção de mais clones positivos. **A:** 2 clones positivos para DMC1 encontrados em células DH5a transformadas (4* e 5*). **B:** PCR dos plasmídeos extraídos de 4 clones positivos (5, 7, 4* e 5*), com ausência de amplificação para DMC1. **C:** Análise de restrição dos plasmídeos extraídos de 6 clones positivos (3,4,5,7,4* e 5*), mostrando ausência do inserto DMC1.

8.6. APÊNDICE F - Trocas genéticas em *T. cruzi* - AdexTA

A fim de analisar a influência do gene de meiose, DMC1 em processo de trocas genéticas em *Trypanosoma cruzi*, foi realizado de forma preliminar um ensaio de trocas genéticas por incorporação de análogos de timidina (ADexTA) em células superexpressoras de DMC1. No único experimento realizado foi possível perceber uma tendência das células superDMC1 em trocarem material genético entre si, com uma porcentagem de recombinantes ligeiramente maior que o WT Dm28c. As misturas foram realizadas por 24h, onde foi possível observar uma porcentagem de recombinantes de aproximadamente 6% em células superDMC1, enquanto em células selvagens esse valor foi de 5%. No entanto, como citado este experimento foi realizado apenas uma vez, necessitando assim de repetições experimentais para se tirar conclusões sobre o papel de DMC1 também como indutor de trocas genéticas em *T. cruzi*.

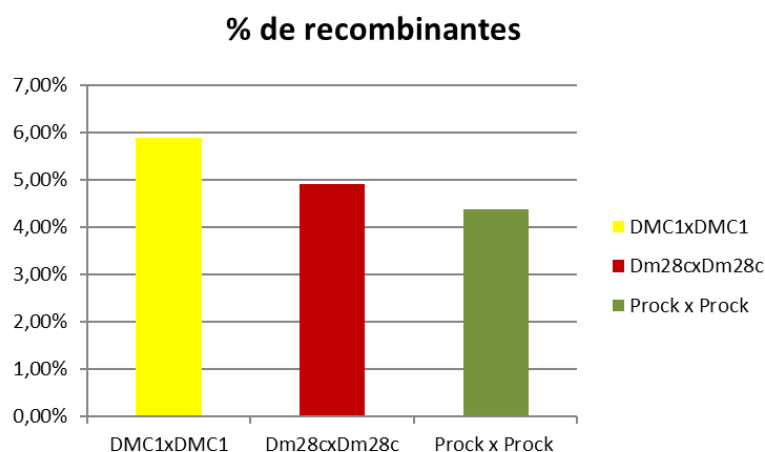


Figura F1 – Análise de trocas genéticas em células de *T. cruzi* superexpressoras de DMC1. Porcentagem de recombinantes em misturas de superDMC1 (DMC1 x DMC1) e em misturas com células controle (Dm28c x Dm28c e Prock x Prock). Experimento realizado apenas uma vez.

8.7. APÊNDICE G - RNAseq para genes de meiose em *T. cruzi* irradiado

Com base em análises de sequenciamento de RNA, a expressão dos transcritos de alguns genes de meiose foi analisada em células de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener) submetidas a 500Gy de radiação ionizante. Os transcritos gênicos de DMC1 e MSH4 foram analisados 4h, 24h e 96h após radiação. Os gráficos abaixo foram construídos com base na média dos valores individuais de expressão em cada amostra e a expressão relativa foi calculada em relação as células não irradiadas para cada gene. Como visto na figura abaixo, a expressão relativa dos genes DMC1 e MSH4 aumenta ao longo do tempo após os parasitas serem irradiados, tendo a expressão máxima em 96h para os tempos analisados. Para o gene MSH4 o aumento da expressão parece ocorrer de forma gradativa, aumentando um pouco a cada tempo analisado, já para DMC1 a expressão aumenta nas primeiras 4h após radiação e parece se manter constante até o tempo de 24h. Considerando que esses são genes que atuam na meiose, acredita-se que o parasita *T. cruzi* quando submetido a radiação gama, pode ativar vias de recombinação meiótica como forma de lidar com os danos provocados pela radiação.

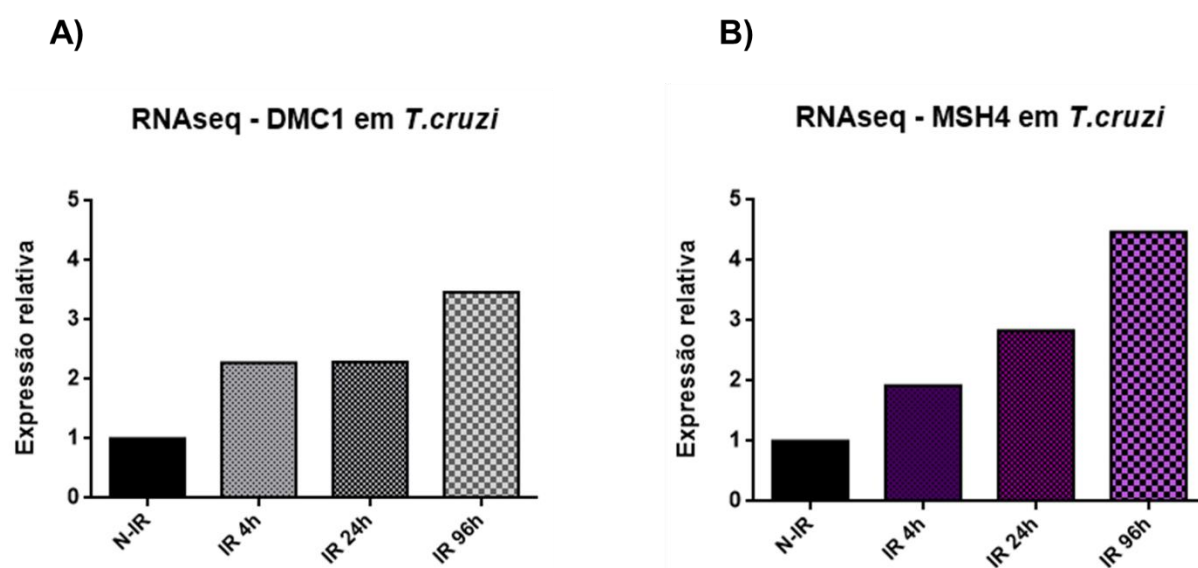


Figura G1 – Expressão relativa de genes de meiose em *T. cruzi*. **A:** Expressão do transcrito DMC1 em CL Brener irradiado (4h, 24h e 96h) e não irradiado (N-IR) com base em análise de RNAseq. **B:** Expressão do transcrito MSH4 em CL Brener irradiado (4h, 24h e 96h) e não irradiado (N-IR) com base em análise de RNAseq.

8.8. APÊNDICE H - Artigos científicos publicados durante o doutorado

1. The *in vivo* and *in vitro* roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions.

PASSOS-SILVA, D.G.; SANTOS, S.S.; NARDELLI, S.C.; MENDES, I.C.; FREIRE, A.C.G.; REPOLÊS, B.M.; RESENDE, B.C.; COSTA-SILVA, H.M.; SILVA, V.S.; OLIVEIRA, K.A.; OLIVEIRA, C.F.B.; VILELA, L.F.F.; NAGEM, R.A.P.; FRANCO, G.R.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; TAHARA, E.B.; SALES JUNIOR, P.A.; MOREIRA, D.S.; TEIXEIRA, S.M.R.; MCCULLOCH, R.; VIRGILIO, S.; TOSI, L.R.O.; SCHENKMAN, S.; ANDRADE, L.A.; MURTA, S.M.F.; MACHADO, C.R.

PLOS Neglected Tropical Diseases, 13 de novembro de 2018, 12(11): e0006875.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875>

2. The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*.

Resende BC, Oliveira ACS, Guañabens ACP, Repolês BM, Santana V, Hiraiwa PM, Pena SDJ, Franco GR, Macedo AM, Tahara EB, Fragoso SP, Andrade LO and Machado CR.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8 de janeiro de 2020, 10:5. doi: 10.3389/fcimb.2020.00005

8.9. APÊNDICE I - Artigo submetido aguardando revisão

1. Sex in protists: A new perspective on the reproduction mechanisms of trypanosomatids

Da Silva, Verônica; Machado, Carlos

Artigo de revisão submetido para publicação.



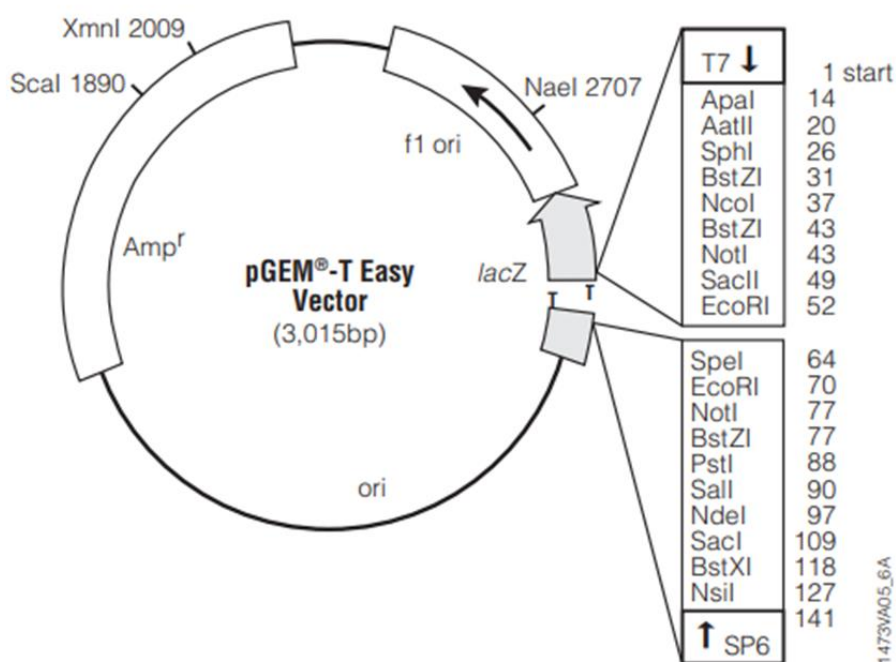
Sex in protists: A new perspective on the reproduction mechanisms of trypanosomatids

Journal:	<i>Genetics and Molecular Biology</i>
Manuscript ID	GMB-2022-0065
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	28-Feb-2022
Complete List of Authors:	da Silva, Verônica; Universidade federal de Minas Gerais, Genética, Ecologia e Evolução Machado, Carlos; Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia,
Keyword:	recombination, sex, Trypanosomatids

SCHOLARONE™
Manuscripts

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega)



pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

9.2. Anexo 2 - Mapa do vetor pET28aTEV

pET-TEV – 5357pb

* The thrombin recognition site of PET28a (Novagen) was replaced by a TEV protease recognition site

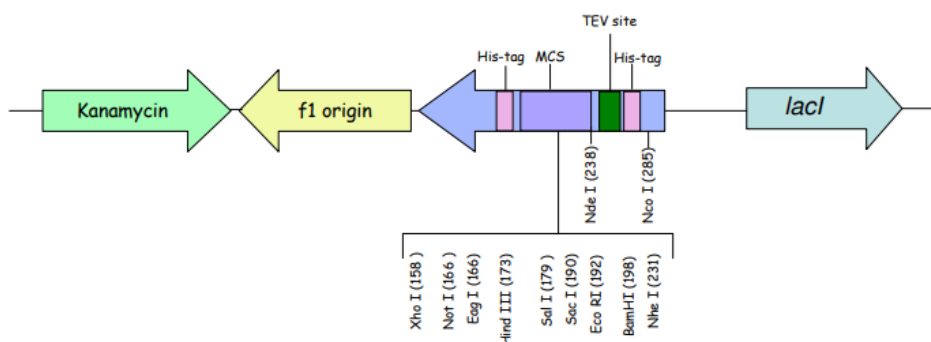
```

XbaI                               NcoI           His tag
aattccccctctagaaaataaatntcgtttaactttaagaaggagatataccatgggccatcatcatcatcatcac
ttaaggggagatctttattanagcaaattgaaattcttctctatatggtacccggtagtagtagtagtagtg
                                     MetGlyHisHisHisHisHisHis

TEV                               NdeI           T7 tag           BamHI   EcoRI   SacI
gaaaacctgtattttcagggccatatggctagatgactgggtggacagcaaatgggtcgcgatccgaattcgagctc
cttttgacataaaaagtcccggtataccgacgtactgaccacctgtcgttaccagcgcctaggttaagctcgag
GluAsnLeuTyrPheGlnGlyHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeu

SalI  HindIII  Not I   XhoI           His tag
cgtcgacaagcttgcggcgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaa
gcagctgttcgaacgcggcgtgagctcgtggtggtggtggtggtgactctagggcgacgattgttcgggctt
ArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd
  
```

pET28a (+) TEV 5357 bp



His-tag coding sequence	207 - 239/265 - 282
TEV site	244 - 264
MCS	158 - 238
<i>lacI</i> coding sequence	1102 - 2181
Kan coding sequence	4376 - 5233
F1 origin	5365 - 5820