

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Estudo sobre o reparo por recombinação
homóloga em diferentes linhagens de
*Trypanosoma cruzi***

Bruno Marçal Repolês

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Belo Horizonte

Agosto de 2015

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Genética

**Estudo sobre o reparo por recombinação
homóloga em diferentes linhagens de
*Trypanosoma cruzi***

Bruno Marçal Repolês

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Belo Horizonte

Agosto de 2015

*A todos que fazem parte da minha vida e me ajudaram
a alcançar esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não existiria sem a ajuda de várias pessoas. E esta ajuda veio de várias formas, seja a partir de ensinamentos, orientações, sugestões, críticas, ajuda em bancada ou até disfarçada como ataques de sinceridade extrema. De um jeito ou de outro são várias as pessoas que se envolveram neste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao professor Carlos Renato que me deu a chance de entrar na vida acadêmica. O seu interesse e entusiasmo, que surgem todos os dias sob a forma de um “E aí? Novidades?” me incentivou muitas vezes a não desanimar com os problemas que encontrei. E claro pela paciência que sempre teve para lidar comigo e disposição para ajudar sempre que foi preciso.

Agradeço também aos professores do laboratório Andrea Macedo e Glória Franco pelas sugestões e críticas durante as reuniões gerais. Aos alunos que passaram pelo Laboratório de Genética Bioquímica durante estes cinco anos, em especial Elizângela (que parece mal humorada, mas é um doce de pessoa e me aguentou bastante), Rodrigo, Isadora, Mika, Mary, Dani Chame, Tiago Bruno e Mainá (muito obrigado pela paciência por me ensinar a arrancar o que sei em bioinformática).

A Neuza, técnica do LGB, por estar sempre de olho e chamando minha atenção por tantas vezes nestes anos, tentando evitar problemas e mostrando a importância de planejar e entender as consequências do que fazemos.

A todos os integrantes do grupo de reparo, Héllida, Anna, Chris, Selma, Bruno 2, Karla, Hugos, João Pedro, Isabela e Ceres. E aos ex-integrantes que marcaram e fazem falta no laboratório: Mari Babys, Pedro e seus olhos, Paula, Matheus e claro a Carol. Agradeço muito à Mari, que é minha irmã (embora as relações de parentesco do laboratório sejam no mínimo estranhas, dessa eu tenho certeza) e como tal sempre me apoiou e aguentou muita coisa (desde piadas horríveis a problemas). Uma pessoa que sei que posso contar sempre.

Em especial agradeço à Isabela e Ceres, o casal mais legal do laboratório. Não sei o que faria nos momentos de problemas, surtos e necessidade sem vocês. Aprendi que sarcasmo é uma forma de ensinar (não é Isabela) e que talvez seja a forma mais legal de aprender. Muito obrigado pela inteligência, paciência e apoio. E encontrei na Ceres a pessoa de maior coração que vi no laboratório. Sem você com certeza nada disso teria acontecido. Mesmo com toda a grosseria, brigas, esquisitice, montes de surtos e problemas que causei muito obrigado por não desistir e estar lá sempre que

precisei. Obrigado por ter me chamado a atenção por todos os finais de semana que fui ao laboratório, me mostrando que tempo realmente é uma coisa relativa (principalmente antes do almoço) e que ainda existe inocência nesse mundo perdido.

Gostaria de agradecer especialmente à Carol. Tive muita sorte de ter encontrado várias pessoas maravilhosas durante meu tempo no laboratório e a pessoa que me iniciou na vida acadêmica não é diferente. Muito obrigado pela paciência, pela ajuda em experimentos, me ensinar a entender tudo o que fazia e me fazer rir o tempo todo que estávamos trabalhando. Não poderia ter tido uma mãe melhor no laboratório.

À Isabella, que foi minha companheira e ponto de suporte durante tanto tempo, me mostrando que às vezes não faz bem pensar tanto em trabalho e a viver a vida de forma mais leve. Muito obrigado.

À meus amigos que me aguentam a dez anos: Pedro, Marcel, Lucas, Guto, Tuti e Sabrina que me lembram da vida além laboratório. E aos amigos que fiz na UFMG, da minha turma ou não, Vinícius (pelos anos de surras em Street e MK, o gosto 8 ou 80 para filmes e por me ensinar que sou bem burro...), Scarpelli, Alexandre, Caetano, Paulo, Maurício, Mary, Léo, Pablo, Fernanda.

Por fim, porém mais importante, agradeço à minha família. Como sempre digo, não poderia ter nascido numa família melhor. Agradeço aos meus pais, Rita e Domingos, por tudo que sempre fizeram por mim. Pelos sacrifícios, pelo suporte incondicional e por tudo que tenho na minha vida. Sei o quão difícil eu sou, e sei o quanto tenho que ser grato pela família que tenho. São as melhores pessoas que conheço. Ao meu irmão Felipe, que é um exemplo em vários aspectos de tudo que quis ser. Teria tanta coisa para agradecer, mas posso dizer apenas muito obrigado por ser meu irmão em todos os sentidos que isso possa ter. À tia Rosa (que mesmo não estando mais presente, foi pessoa fundamental em minha vida) e tio Renato, meus padrinhos que sempre foram fantásticos. Minha família é o principal motivo pelo qual alcancei qualquer conquista e esta com certeza não é diferente.

Agradeço do fundo do coração a todos!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de tabelas.....	ii
Lista de Abreviaturas.....	iii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	3
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	3
1.2. Variabilidade genética em <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.2.1. Mecanismos envolvidos na geração de variabilidade em tripanossomatídeos.....	9
1.3. Metabolismo de DNA	11
1.3.1. Resposta ao dano ao DNA.....	11
1.3.2. Vias de reparo de DNA	13
1.4. Efeitos da radiação ionizante	15
1.5. Reparo de quebra de fitas duplas	17
1.5.1. Reparo por recombinação homóloga	17
1.5.2. Mecanismos moleculares da recombinação homóloga.....	19
1.5.3. Reparo de quebra de fita dupla em tripanossomatídeos	22
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Metodologia	25
3.1. Células e meio de cultura	25
3.2. Predição de estrutura por modelagem	25
3.3. Docking.....	26
3.4. Irradiação de células	26
3.5. Curva de crescimento.....	27
3.6. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	27
3.7. PCR em Tempo Real	28
4. Resultados	30
4.1. Avaliação da resposta à radiação ionizante de diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> 30	
4.2. O atraso na retomada de crescimento é comum a outras cepas de linhagens não híbridas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31

4.3. Análise da sequência das principais proteínas envolvidas no reparo por recombinação homóloga em tripanossomatídeos	34
4.4. A proteína BRCA2 das cepas em estudo apresentam diferenças com relação à estrutura 43	
4.5. A interação predita entre as proteínas Rad51 e BRCA para cada cepa apresenta diferenças.....	48
4.6. Os níveis de transcrição dos genes BRCA2 e Rad51 são diferentes para as cepas estudadas	50
4.7. A presença de cafeína causa atraso na resposta à irradiação ionizante.....	52
5. Discussão.....	55
6. Conclusões.....	62
7. Bibliografia	63

Lista de Figuras

Figura 1 - Morfologia e principais formas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 3 - Relações filogenéticas entre as linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 4 - Fontes de danos ao DNA e suas vias de reparo	15
Figura 5 - O processo de reparo por recombinação homóloga	18
Figura 6 - Curva de crescimento de diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> submetidos à radiação ionizante.....	31
Figura 7 - Curva de crescimento de outras cepas representantes de linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 8 - Curva de crescimento de outra linhagem ancestral após exposição à radiação ionizante. .	33
Figura 9 - Análise da proteína Mre11.....	36
Figura 10 - Análise da proteína Rad50.	37
Figura 11 - Análise da proteína NBS1.....	39
Figura 12 - Análise da proteína RPA.....	40
Figura 13 - Análise da sequência da proteína Rad51	41
Figura 14 - Análise da proteína BRCA2.....	42
Figura 15 - Alinhamento da região dos motivos BRC em <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
Figura 16 -Melhores estruturas geradas a partir da modelagem por homologia da proteína BRCA2 das três cepas	46
Figura 17 - Sobreposição destacando os motivos BRC em cada proteína	47
Figura 18 - Gráficos dos valores de HADDOCK score x RMSD para cada motivo BRC.	49
Figura 19 - Nível de transcrição dos genes Rad51 e BRCA2 antes da exposição à 500Gy de radiação ionizante.....	51
Figura 20 - Aumento no nível de transcrição dos genes Rad51 e BRCA2 para cada cepa	51
Figura 21 - Comparação do aumento entre as cepas irradiadas e não-irradiadas	52
Figura 22 - Curva de crescimento após tratamento com cafeína e irradiação com 500Gy de radiação ioinizante.....	53
Figura 23 - Curva de crescimento de diferentes linhagens pré-tratadas com cafeína e expostas à 500Gy de radiação ionizante.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a PCR em Tempo Real.....	29
Tabela 2 - Análise das principais proteínas envolvidas no HRR destacadas com sua função no processo, tamanho da proteína e domínios funcionais identificados pelo software Pfam.....	35
Tabela 3 - Valores da interação para a proteína BRCA2 nas diferentes regiões.....	48

Lista de Abreviaturas

BER: Base Excision Repair – Reparo por excisão de bases

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

DNA: Acido desoxirribonucleico

DSB: Double Strand Break – quebra de fita dupla

HR: Homologous Recombination – Recombinação Homóloga

kDNA: DNA do cinetoplasto

LIT: Liver Infusion Tryptone

mRNA: RNA mensageiro

NER: Nucleotide Excision Repair – Reparo por excisão de nucleotídeo

NHEJ: Non-Homologous End Joining

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RNA: Acido ribonucleico

SFB: Soro Fetal Bovino

UV: Ultravioleta

VSG: Variant Surface Glycoprotein - Glicoproteína Variante de Superfície

WHO: World Health Organization

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. A variedade de sintomas da doença de Chagas pode estar relacionada com a variabilidade genética de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Estudos de infecção com diferentes misturas de linhagens do parasito demonstraram diferença no tropismo entre representantes de cepas distintas, demonstrando que a variabilidade genética entre populações do parasito resulta em fenótipos distintos. Apesar das incertezas quanto à posição de determinadas populações de *Trypanosoma cruzi* e suas relações filogenéticas, tem-se a divisão destas populações em seis linhagens taxonômicas distintas. Mesmo que relatos da ocorrência de eventos de recombinação sejam raros na literatura, sabe-se que eles ocorreram entre essas populações, gerando uma divisão entre linhagens híbridas e não-híbridas deste parasito. O metabolismo de DNA de *Trypanosoma cruzi* é foco de estudo de nosso grupo. Uma das vias de reparo de DNA é a via de reparo por recombinação homóloga. Esta via é responsável por lidar com quebras nas fitas dupla de DNA, geradas por agentes externos ou pelo metabolismo dos organismos. Tendo em vista este fato, estudamos a resposta à radiação ionizante (um causador de quebras de fitas dupla) em diferentes cepas representantes de linhagens distintas de *Trypanosoma cruzi*. Após a exposição à 500Gy de radiação ionizante, foi observado que linhagens não-híbridas apresentam um fenótipo distinto de linhagens híbridas com relação a resposta a estes danos. As linhagens não híbridas possuem uma retomada de crescimento mais rápida quando comparadas com a linhagem híbrida CI Brener. A análise dos genes envolvidos no reparo mostrou diferenças na sequência de certas proteínas entre as cepas, e a predição do impacto destas modificações, a partir da análise de interação pelo software HADDOCK, demonstrou que a interação entre as proteínas de cada cepa pode ser distinta. A partir de PCR em tempo real, foi visto que os níveis basais de transcritos para as proteínas BRCA2 e Rad51, essenciais ao processo, são diferentes entre as cepas podendo. Demonstramos também, que a sinalização para o reparo das quebras de fita dupla é rápida e importante para o processo, já que a inibição utilizando cafeína destas vias de sinalização é capaz de atrasar a retomada de crescimento após a irradiação. Pudemos concluir que a resposta à radiação ionizante é diferente entre cada uma das cepas estudadas, assim como parece que linhagens híbridas respondem melhor à estas quebras, que pode estar relacionada com níveis distintos das proteínas Rad51 e BRCA2 entre as cepas. Concluimos também que a sinalização é importante e rápida após a exposição à radiação ionizante e igual para toda as cepas estudadas.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas Disease. The variety of symptoms of Chagas disease can be associated with the genetic variability of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Studies of infection with different mixtures of different parasite strains demonstrated difference in tropism among them, demonstrating that the genetic variability among parasite populations result in different phenotypes. Despite the uncertainty about the position of certain populations of *Trypanosoma cruzi* and their phylogenetic relationships, phylogeny studies recently subdivided *T. cruzi* into six discrete taxonomic units, named T. cruzi I to T. cruzi VI. Even though reports the occurrence of recombination events are rare in the literature, it is known that they occur between populations, creating a division between hybrid and non-hybrid populations of the parasite. The *Trypanosoma cruzi* DNA metabolism is focus of study of our group. Repair by homologous recombination is one of the major DNA repair pathways. This pathway is responsible for dealing with breaks in the double strands of DNA, generated by external agents or the metabolism of organisms. While other organisms have other pathways, such as non-homologous end joining to deal with double strand breaks, *Trypanosoma cruzi* relies only on repair by homologous recombination to deal with this kind of damage, since major proteins on the non-homologous endjoining pathway could not be identified. In view of this fact, we studied the response to ionizing radiation, an agent capable of causing double strand breaks, in different strains of *Trypanosoma cruzi*. Although the parasite does not face high doses of radiation on his life cycle, it can resist to doses as high as 500Gy of ionizing radiation. It was observed, after the exposure to ionizing radiation, that non-hybrid lineages have a distinct phenotype from hybrid lines in response to this kind of damage. The analysis of genes involved in the repair revealed differences in the sequence of certain proteins between strains, and the prediction of the impact of these changes made on HADDOCK software, showed that the interaction between the proteins of each strain could be different. Also, the basal levels of transcripts of the proteins BRCA2 and Rad51, essential to the process, are different between the strains could mean the difference in observed phenotype. We also demonstrate that cell signaling is quick and important to the repair process, since the inhibition of signaling pathways is able to delay the resumption of growth after irradiation

1. Introdução

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, em homenagem à Carlos Chagas que identificou e descreveu seu agente etiológico em 1909 (Chagas 1909), é uma doença antes endêmica da América Latina, mas hoje encontrada em diversas regiões do mundo. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas convivem com a doença na América Latina, ao passo que mais de 300 mil casos já foram relatados em outras regiões do mundo (Hotez et al. 2012). A doença de chagas é responsável pela morte de 10 mil a 14 mil mortes por ano e cerca de 80 milhões vivem em condições de alto risco de infecção (Rassi & Marin-Neto 2010).

O *Trypanosoma cruzi*, descrito como agente etiológico da doença de Chagas é um parasita protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida que inclui, além do gênero *Trypanosoma*, também o gênero *Leishmania*. Os membros da ordem Kinetoplastida são caracterizados principalmente por conterem uma mitocôndria única e alongada (Figura 1) que percorre o corpo celular do parasito, denominada cinetoplasto. O DNA mitocondrial é formado por uma rede de anéis concatenados chamados de minicírculos e maxicírculos (Simpson et al. 1980), denominado kDNA, e é localizado próximo ao corpo basal do flagelo dos tripanossomatídeos. O flagelo, por sua vez, se localiza na bolsa flagelar, de onde ele pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário vá assumir (Brisse et al. 2003).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* é complexo, envolvendo dois hospedeiros e uma forma intracelular replicativa obrigatória (Figura 2). Em cada um destes hospedeiros e fases de desenvolvimento o parasito assume uma diferente morfologia. A infecção se inicia no momento do repasto sanguíneo pelo hospedeiro invertebrado que no ambiente natural pode ser um dos mais de 130 hemípteros da família Reduviidae. Durante este processo, o inseto vetor defeca próximo ao local da ferida. Estas fezes contaminadas com a forma tripomastigota do parasito, quando atingem a corrente sanguínea, infectam as células do hospedeiro vertebrado. Dentro destas células, o parasito se diferencia para sua forma amastigota replicativa que se divide por divisão binária. Após vários ciclos de replicação, o parasito volta a se diferenciar na forma tripomastigota e a célula hospedeira é destruída, liberando-os na corrente sanguínea. Neste momento ocorre um ciclo de reinfecção, aumentando a quantidade de parasitos no hospedeiro, resultando em alguns dos sintomas clínicos da doença. Outro inseto vetor que se alimenta do sangue deste hospedeiro

vertebrado infectado adquire esta forma tripomastigota sanguínea e, no trato digestivo deste inseto, estas células se diferenciam em sua forma epimastigota replicativa. Após a replicação, o parasito novamente se diferencia na forma infectiva tripomastigota metacíclica que ao ser eliminada nas fezes, durante o próximo repasto, podem iniciar o novo ciclo de infecção (Brener 1973; Prata 2001).

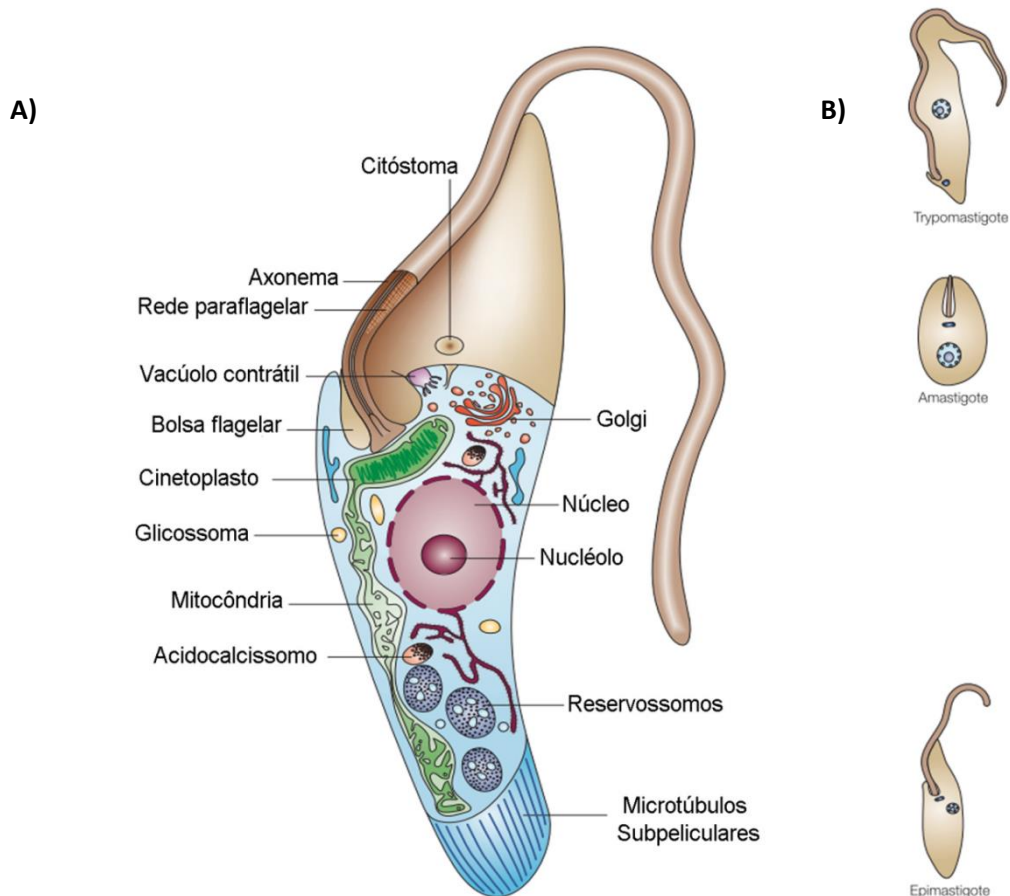


Figura 1 - Morfologia e principais formas do parasito *Trypanosoma cruzi* – A) representação esquemática da forma infectiva tripomastigota de *T. cruzi*, destacando as principais estruturas celulares como a mitocôndria única e alongada percorrendo o corpo celular do parasito, o cinetoplasto, a bolsa flagelar e o núcleo. B) As principais formas que o parasito assume durante seu ciclo de vida. As formas tripomastigota e amastigota são encontradas no hospedeiro vertebrado, sendo a forma amastigota a forma replicativa intracelular; a forma epimastigota é encontrada no inseto vetor. Uma das principais diferenças entre estas formas está na posição relativa entre o corpo basal, o cinetoplasto e o núcleo e a posição do flagelo. (Adaptado de Docampo et al 2005)

O homem é um hospedeiro acidental do *Trypanosoma cruzi*, resultado da retirada do inseto vetor de seu ciclo silvestre habitual. A sua infecção se dá, principalmente, pelo contato com fezes infectadas de hemípteros da subfamília Triatominae durante a sua alimentação. Além disso, a infecção também pode ocorrer por transfusão sanguínea,

transplante de órgãos, infecção congênita, acidentes em laboratórios e alimentos contaminados (Prata 2001).

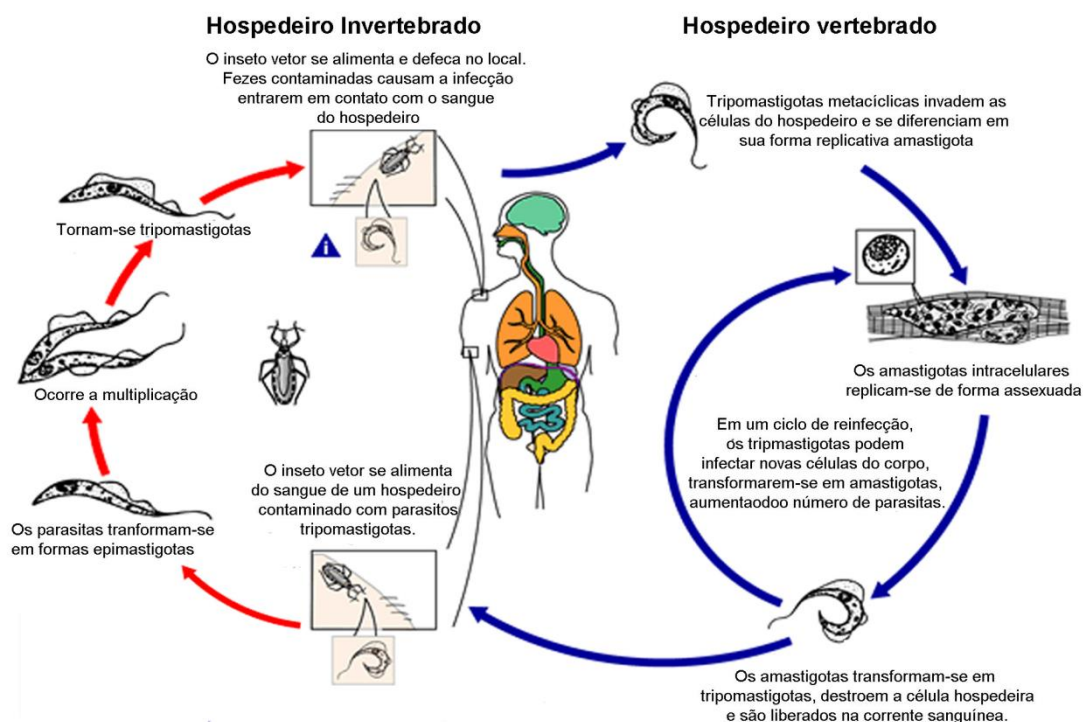


Figura 2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* – O esquema representa o ciclo de vida do parasito, destacando suas formas (tripomastigota metacíclica, amastigota intracelular, epimastigota e tripomastigota) bem como os hospedeiros onde cada uma delas ocorre. (Figura adaptada de CDC – Center for Disease Control, disponível em www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html)

Existe uma variedade de sintomas decorrentes da infecção pelo parasito que caracteriza a Doença de Chagas. O quadro clínico é bastante variável, envolvendo sintomas brandos e inespecíficos, a até mesmo manifestações severas da doença que acometem sistemas circulatório e digestório, como o megacólon e a miocardite chagásica (Prata 2001). Tal variedade de sintomas pode estar relacionadas com diversos fatores relacionados tanto com o parasito quanto com o hospedeiro. Fatores ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro, assim como a diversidade e heterogeneidade populacional existente em *T. cruzi* poderiam estar envolvidos com este quadro clínico variável (Macedo et al. 2004). Diversos estudos já mostraram que diferentes grupos de *T. cruzi* apresentam particularidades fenotípicas como tropismo celular, sensibilidade à quimioterápicos, morfologia, cinética de crescimento e aspectos únicos no metabolismo (Buscaglia & Di Noia 2003).

O tratamento da Doença de Chagas (comumente feito com as drogas Benzonidazol e Nifurtimox) não é considerado ideal, visto que as drogas apresentam efeitos colaterais e,

dependendo da fase da doença, uma proporção de cura de apenas 20% (Rajão et al. 2014). Já foram também reportados relatos de resistência, natural ou adquirida, ao tratamento, juntamente com os mecanismos que poderiam fazer esta resistência surgir em populações de *T. cruzi* (Filardi & Brener 1987; Mejia et al. 2012). Vários estudos tentam desvendar mecanismos ou possíveis drogas para o tratamento, partindo de funções de proteínas essenciais à sobrevivência do parasito ou proteínas específicas da mitocôndria (Silva Paes et al. 2011), como abordagens de bioinformática buscando inibidores específicos (Bellera et al. 2013). Alguns trabalhos tentam relacionar aspectos únicos do metabolismo de DNA do parasito, visando minimizar a toxicidade do tratamento para o paciente (Zuma et al. 2011). Dessa forma, compreender o metabolismo de DNA em *T. cruzi* poderia elucidar os mecanismos envolvendo a biologia do parasito e permitir potenciais novas vias de tratamento para a doença.

1.2. Variabilidade genética em *Trypanosoma cruzi*

Apesar de constituir um grupo monofilético, vários estudos mostram que a estrutura populacional de *T. cruzi* é complexa e um dos questionamentos acerca do parasito é justamente na relação entre as cepas existentes e suas características epidemiológicas, como as diferentes manifestações clínicas da doença nas diversas regiões em que ocorre (Prata 2001). Estas diferenças estão relacionadas com as características do próprio parasito, como também de seu hospedeiro (Andrade et al. 2002). Estudos de infecção com diferentes misturas de linhagens do parasito demonstraram diferença no tropismo entre representantes de cepas distintas. Esta diferença estaria não relacionada somente com a capacidade de infecção, mas também com a replicação intracelular diferencial entre cada cepa do parasito (Andrade et al. 2010). Existe, portanto, a necessidade de se compreender a heterogeneidade existente nas populações de *Trypanosoma cruzi*.

Os primeiros esforços geraram uma classificação apoiada pelo estudo de isoenzimas do parasito, reconhecendo dois grupos distintos de *T. cruzi*: *T. cruzi* I (associada com o ciclo silvestre de infecção) e *T. cruzi* II (associada ao ciclo doméstico de infecção). Algumas cepas, porém, não puderam ser atribuídas à nenhum destes grupos devido a seu caráter híbrido (Annonymous 1999). Alguns estudos ainda reforçaram a associação de cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* II com a infecção humana em algumas regiões do Brasil, enquanto a associação com cepas pertencentes à linhagem *T. cruzi* I são escassas (Freitas et al. 2005).

O avanço dos estudos levou à criação das unidades taxonômicas discretas (DTU), que foram definidas como grupos geneticamente relacionados que podem ser identificados por marcadores moleculares comuns (Tibayrenc 1998). O uso de novas técnicas de biologia molecular (como PCR de marcadores específicos e RAPD) juntamente com a tipagem de isoenzimas, demonstraram mais claramente a diversidade existente no táxon *T. cruzi*. Estes estudos propuseram uma nova classificação das DTUs do parasito, dividindo as duas anteriormente existentes em seis, denominadas DTUs I, IIa, IIb, IIc, IId e IIe. Nesta classificação, a DTU *T. cruzi* I continuou como sendo uma DTU única, ao passo que a DTU *T. cruzi* II foi subdividida e passou a englobar cepas que não haviam sido classificadas anteriormente (Brisse, Barnabé, et al. 2000).

Novos estudos, desta vez utilizando sequências do gene mini-éxon, demonstraram a presença de um terceiro grupo que havia sido incluída como sendo da DTU IIc. Estes estudos levaram à caracterização de uma terceira linhagem ancestral distinta de *T. cruzi*, denominada *T. cruzi* III (Brisse, Dujardin, et al. 2000; Freitas et al. 2005). O uso de iniciadores para regiões específicas do DNA do minicírculo dos parasitas demonstrou que é possível rastrear a linhagem do parasito a partir de uma reação de PCR, assim como uma associação entre a linhagem de *T. cruzi* e a ocorrência de infecção congênita (Burgos et al. 2007).

As evidências do aumento da complexidade das relações filogenéticas entre as cepas em estudo levou à uma nova classificação, na qual foi sugerida a existência de seis DTUs, nomeadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales et al. 2009). Esta nova divisão foi corroborada por outros estudos que demonstraram a distribuição geográfica e a associação de aspectos comuns entre as DTUs e seu ciclo de transmissão (Zingales et al. 2012). Porém, apesar de todos estes esforços, nenhum dos marcadores utilizados conseguiram, isoladamente, resolver as relações filogenéticas existentes entre as linhagens.

A dificuldade em se conseguir elucidar estas relações filogenéticas poderia estar relacionada com a forma de reprodução do parasito e com possíveis eventos de troca genética entre as linhagens. Em *Trypanosoma cruzi* é proposto uma estrutura predominantemente clonal para as populações. As análises sobre o número de genótipos observados nas populações de *T. cruzi* demonstraram um número inferior de combinações teoricamente possíveis, além de uma forte desequilíbrio de ligação entre os marcadores genéticos usados, levando à esta proposição (Tibayrenc & Ayala 2002). Existem, porém, cepas híbridas em populações naturais do parasito, como o clone CI Brener (El-Sayed et al. 2005), e a hipótese clonal tem sido contestada por alguns autores. Um dos principais trabalhos a questionar a hipótese de reprodução clonal exclusiva em *T. cruzi* foi realizado

em 2003, quando Gaunt e colaboradores mostraram um evento de troca de material genético entre isolados de *Trypanosoma cruzi* a partir da mistura de duas populações distintas com diferentes marcadores de resistência à drogas. Após alguns ciclos em passagem por cultura de células eles foram capazes de recuperar uma população de parasitos duplo resistentes e comprovaram a presença de ambos genes de resistência nestas populações mistas (Gaunt et al. 2003). Este trabalho pode explicar a observação de linhagens híbridas em populações naturais do parasito. Outros estudos também corroboram a ocorrência de eventos de recombinação genética (Baptista et al. 2014; Brisse et al. 2003).

Duas hipóteses tentam elucidar a história evolutiva destas DTUs (Figura 3a). A primeira sugere a ocorrência de dois eventos de hibridização entre as linhagens ancestrais, sendo o primeiro entre as linhagens TcI e TcII e o segundo envolvendo as linhagens TcII e TcIII (Westenberger et al. 2005). A segunda hipótese sugere que ambos eventos de hibridização teriam ocorrido entre cepas das linhagens TcII e TcIII, sendo que outras evidências reforçam a ocorrência destes dois eventos de hibridização (De Freitas et al. 2006). Recentemente, estudos com o fator de virulência Trans-sialidase demonstraram que as DTUs TcIII e TcIV seriam derivadas da DTU TcI (Burgos et al. 2013), porém a relação exata das cepas pertencentes à DTU TcIV ainda não é bem estabelecida.

Apesar das incertezas, tem-se que as cepas representantes das linhagens TcI e TcII são ancestrais, com esta última tendo divergido primeiro em comparação com a outra, ao passo que o sequenciamento da cepa CI Brener, representante da linhagem TcVI, mostrou que essa cepa é fruto de um evento de hibridização, possivelmente das linhagens TcII e TcIII (Baptista et al. 2014). Estes eventos são apoiados por estudos do genoma e de marcadores dos parasitos, além da distribuição geográfica dos mesmos. Como mostrado na figura 3B, a distribuição geográfica da cepa CI Brener (DTU TcIV) se sobrepõe com regiões de distribuição de cepas das linhagens TcII e TcIII.

A geração de híbridos e a frequência com que eventos de recombinação ocorrem podem estar relacionados diretamente com o metabolismo do DNA do parasito. Esta alta variabilidade intraespecífica pode ter sua razão justamente nos processos de metabolismo de DNA do parasito. Dessa forma, pode haver uma relação entre as vias de reparo e a forma como o parasito mantém seu genoma durante o ciclo de vida, a história evolutiva das populações do parasito e a variedade de sintomas observados durante o curso das infecções.

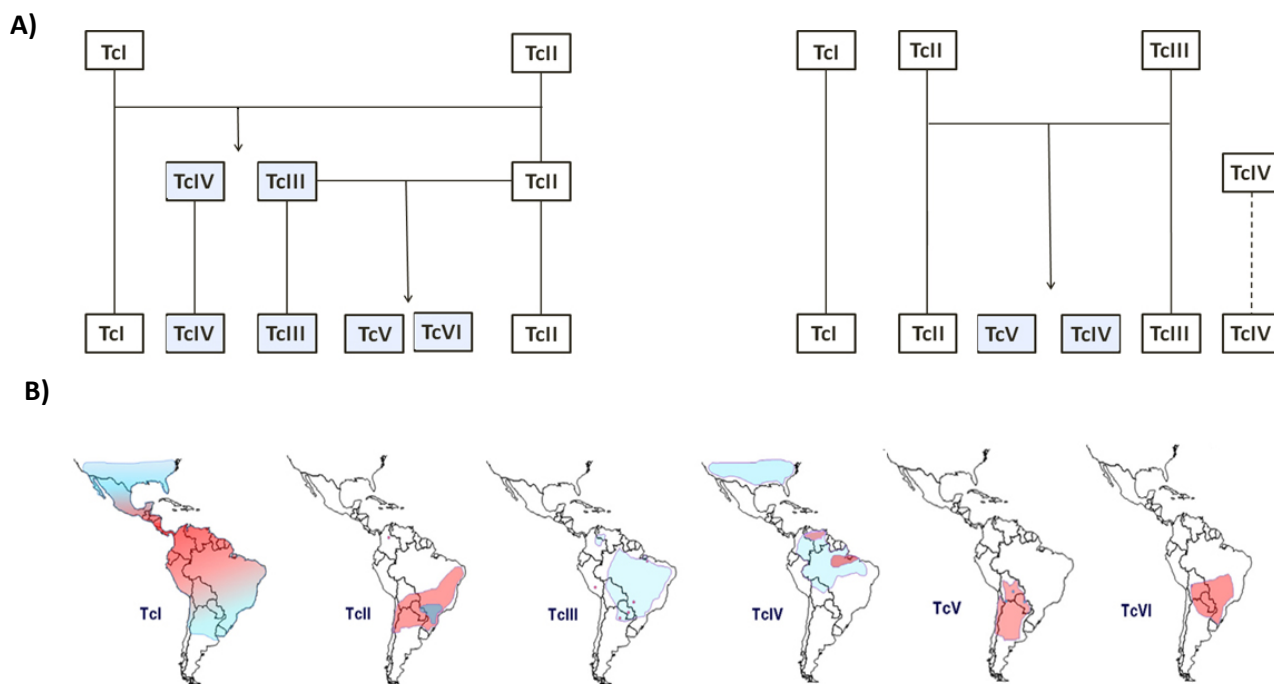


Figura 3 - Relações filogenéticas entre as linhagens de *Trypanosoma cruzi* – A) As duas principais teorias existentes que tentam explicar as relações filogenéticas entre as variadas populações de *Trypanosoma cruzi*. A primeira hipótese relaciona as DTUs TcI e TcII como ancestrais, e teriam ocorrido dois eventos de hibridização distintos, o primeiro dando origem as DTUs IV e III (a partir de um híbrido formado por TcI e TcII), e o segundo evento originando TcV e TcVI (a partir do híbrido de TcII e TcIII). Na segunda hipótese as DTUs TcI, TcII e TcIII seriam ancestrais, e um evento de hibridização entre TcII e TcIII teria originado as cepas das DTUs TcV e TcVI. A posição da DTU TcIV não é bem estabelecida, porém existem indícios de sua maior proximidade com TcI. As cepas híbridas em cada hipótese estão destacadas. B) A distribuição geográfica de cada uma das DTUs (em azul o ciclo silvático e em vermelho o ciclo doméstico). Como fica demonstrado, as cepas pertencentes às DTUs TcVI se sobrepõem com as regiões ocupadas pelas cepas das DTUs TcII e TcIII, corroborando a hipótese da ocorrência de híbridos em populações naturais. (Adaptado de Zingales, 2012)

1.2.1. Mecanismos envolvidos na geração de variabilidade em tripanossomatídeos

A história evolutiva distinta do parasito pode estar relacionada diretamente com o metabolismo de DNA dos mesmos. Já foram encontradas diversas características únicas de cada táxon, relacionados ao processo de metabolismo e reparo de DNA. *Trypanosoma cruzi* possui aspectos únicos relacionados à sua composição de DNA. Seu genoma, por exemplo, é constituído de sequências repetitivas e possui um grande número de genes que fazem parte de famílias multigênicas de proteínas de superfície (El-Sayed et al. 2005). Em sua forma epimastigota, até 25% do DNA total do parasito está no cinetoplasto. Os minicírculos do kDNA codificam RNA's guias que são capazes de modificar os transcritos do maxicírculos a partir de edição, adicionando ou deletando resíduos de uridilato. Os maxicírculos possuem, por sua vez, genes correspondentes ao DNA de eucariotos superiores, codificando RNA's ribossomais e subunidades do complexo respiratório

(Cavalcanti et al. 2009). Uma forma de tentar se compreender a geração da variabilidade nestes parasitos é feita a partir do estudo de famílias gênicas envolvidas com o escape do sistema imune do hospedeiro.

A existência da variabilidade genética e alta divergência em *Trypanosoma cruzi* possui vários possíveis mecanismos para existir, desde o processo de recombinação e conversão gênica a até mesmo a geração de mutações devido ao ambiente de estresse oxidativo e até mesmo a partir das proteínas responsáveis por lidar com este estresse (Aguiar & Furtado 2013). *T. cruzi* infecta e se adapta às condições de seu hospedeiro utilizando-se de diferentes famílias de proteínas de superfície, gerando uma série de antígenos distintos. Esta estratégia é chave para o processo de invasão, escape do sistema imune e sucesso da infecção (Frasch 2000). Abordagens *in silico* já demonstraram vários possíveis mecanismos de geração de variabilidade em famílias multigênicas distintas. Simulações demonstraram que famílias multigênicas distintas evoluem de forma interdependente e são afetadas por processos de variabilidade também de forma distinta. A geração de mutações aumenta a divergência entre regiões duplicadas destas famílias, ao passo que a convergência diminui esta divergência. Genes que codificam proteínas nucleares, por exemplo, tendem a diminuir ao máximo a variação fenotípica gerada por estas variações, ao passo que o oposto ocorre em proteínas de superfície. O tipo de mecanismo utilizado, como processos de recombinação ou geração de mutações de ponto, está relacionado com esta variação (Azuaje et al. 2007). O genoma do parasito é organizado de forma a permitir que ele possua uma vasta gama de genes envolvidos de forma a maximizar sua capacidade de infecção e escape do sistema imune.

A família das proteínas de superfície MASP, por exemplo, possui seus genes intercalados com outros genes de outras famílias de proteínas de superfície. Desta forma, eventos de conversão gênica têm sua capacidade de diminuir a variação destas sequências minimizada. A organização desta família amplia o repertório de peptídeos que podem interagir com os receptores das células hospedeiras, já que este agrupamento permite a combinação de sequências de genes distintos. Uma evidência desta organização especial é a presença de um grande número de pseudogenes e de retrotransposons nestas regiões, uma indicação que esta região seria propensa a sofrer rearranjos (Bartholomeu et al. 2009). Juntamente com a pressão imposta pelo estresse gerado pelo sistema imune do hospedeiro, cria-se um ambiente que favorece a diversificação das proteínas de superfície.

O agente etiológico da doença do sono, *Trypanosoma brucei* (juntamente com *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* forma o grupo dos tripanossomatídeos), possui um mecanismo diferente na geração de variabilidade. *Trypanosoma brucei* possui um

revestimento composto por glicoproteínas de superfície variante (VSG do inglês *variant surface glycoprotein*). Durante a infecção, o parasito expõe apenas um único tipo de glicoproteína que pode ser trocado periodicamente (Hartley & McCulloch 2008). Neste processo, a recombinação homóloga tem papel crucial, já que mutações em proteínas chave para o processo impedem ou atrapalham a ocorrência da troca de VSG em *T. brucei* (McCulloch & Barry 1999). Este processo de troca ocorre puramente devido a processo de quebras e rearranjos no DNA do parasito. Durante a infecção, ao mesmo tempo que uma das VSG's permanece ativa e expressa continuamente, o parasito mantém mais de 1000 membros da mesma família inativas. Este controle de expressão envolve mecanismos epigenéticos e permite que a VSG escolhida tenha um aumento de cerca de 10.000 vezes nos níveis de transcritos enquanto as outras são reprimidas. A troca ocorre quando, por um processo de recombinação, a VSG no sítio de expressão ativa é trocada por uma das presentes em sítios inativos. Este mecanismo, além da troca da variante expressa, também pode gerar novas variantes a partir de pseudogenes existentes no genoma do parasito (Horn & McCulloch 2010).

1.3. Metabolismo de DNA

1.3.1.Resposta ao dano ao DNA

O processo de resposta ao dano ao DNA é complexo e envolve desde proteínas que evitam a incorporação de moléculas danificadas ao DNA (Aguiar & Furtado 2013), processos de sinalização celular (Wang 1998; Zhou & Elledge 2000; Adams et al. 2006), tolerância ao dano e diversas proteínas envolvidas diretamente com o processo de reparo. São os intermediários e estruturas anormais que o DNA pode assumir que irão determinar qual via de reparo será acionada (Cline & Hanawalt 2003).

Durante o tempo de vida, todos os organismos expõem o DNA à diversos tipos de agentes genotóxicos de origem endógena e exógena. O metabolismo dos próprios organismos é capaz de gerar moléculas que levam à danos ao DNA. Os agentes endógenos surgem principalmente como produtos indesejados das vias metabólicas, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), além de radicais metil e alquil. Estes tipos de moléculas são capazes de causar modificações à bases do DNA podendo ocasionar mutações durante o ciclo celular (Pluskota-Karwatka 2008). Agentes ambientais, tais como a luz ultravioleta, radiação ionizante ou até mesmo agentes químicos são fontes exógenas de danos à molécula de DNA, como quebras de fitas dupla, erros de pareamento e crosslinks

(Hoeijmakers 2001). Por fim, existem reações espontâneas como a desaminação de citosinas que podem levar à mutações no DNA caso não sejam reparadas corretamente (Krokan et al. 2002).

A resposta ao dano no DNA (DDR do inglês *DNA damage response*) envolve várias vias do metabolismo celular que visam identificar o dano (a partir da alteração na estrutura da dupla hélice causada pela modificação ou lesão), causar uma amplificação de sinais em resposta à este dano e acionar as devidas maquinarias de reparo. Dentre os principais efeitos de danos ao DNA estão a parada do ciclo celular e até mesmo a ativação de vias de morte celular (Bensimon et al. 2011). Responder de forma correta à estes danos é, portanto, de vital importância para a estabilidade genômica e viabilidade celular.

Duas proteínas essenciais nesta resposta ao dano no DNA são as proteínas ATM (Ataxia telangiectasia mutated) e ATR (Ataxia telangiectasia Rad 3 related). Estas duas proteínas são cinases e atuam como principais sensores da resposta ao dano no DNA. A proteína ATR é ativada em resposta à diferentes tipos de danos, porém a presença de uma porção de DNA de fita simples parece ser crucial para este processo.

A proteína ATM é tida como uma proteína central na resposta à danos ao DNA como os causados pela radiação ionizante (Adams et al. 2006). A ativação de ATM durante a geração de quebras de fitas dupla é dependente de seu recrutamento pelo complexo MRN (formado pelas proteínas Mre11-Rad50-NBS1). Sua ativação leva à cascata de fosforilação de outras proteínas quinases (como CHK1 e CHK2) que leva ao controle das respostas metabólicas integradas relacionadas à apoptose, reparo, parada do ciclo celular e controle da estrutura da cromatina (Zhou & Elledge 2000).

O processo de sinalização celular é um dos primeiros efeitos causados na célula, porém todo o metabolismo celular passa por alterações, além da óbvia mobilização das proteínas das vias de reparo. Em alguns organismos, entre eles o *T. cruzi*, ocorre uma modulação dos níveis de RNA mensageiro, visando reprimir o metabolismo energético e a tradução de proteínas, ao passo que RNA's não codificadores e retrotransposons, além de outros RNA's de função não identificada possuem níveis de transcrição aumentados (Grynberg et al. 2012). Em organismos multicelulares, a resposta também pode depender do tecido em questão. Organismos distintos também podem apresentar peculiaridades em suas respostas ao dano no DNA. Em leveduras, o dano ao DNA causado por MMS leva à uma diminuição nos níveis de transcritos relacionados à síntese de RNA e proteínas e são ativadas vias de mecanismos que degradam proteínas danificadas. Este padrão se altera dependendo da fonte de dano à molécula de DNA (Fry et al. 2005).

As respostas que os organismos desencadeiam quando expostos à agentes de danos ao DNA são diversas, e causam modificações variadas no metabolismo celular. Estas alterações envolvem não somente vias de reparo, mas de forma geral, também vias de metabolismo energético, degradação e síntese de proteínas (Harper & Elledge 2007; Fry et al. 2005).

1.3.2.Vias de reparo de DNA

Alguns processos do metabolismo de DNA são essenciais e, muitas vezes, enzimas do próprio organismo envolvidas nesses processos podem ser capazes de gerar lesões e danos à molécula de DNA (Jankovic et al. 2007). Quebras de fitas dupla, por exemplo, são essenciais durante a geração de receptores de antígenos durante a maturação de linfócitos. Proteínas RAG1 e RAG2 são capazes de gerar estas quebras de fita dupla em sequências sinais específicas durante o processo de recombinação V(D)J (Jankovic et al. 2007).

Vários agentes podem causar danos ao DNA e os organismos possuem vias de reparo para lidar com estes danos (Figura 4). A maior parte das modificações ocorridas no genoma serão reparadas pelas vias de excisão de base (BER) e de nucleotídeos (NER). A via de reparo por excisão de bases é capaz de tratar lesões decorrentes de oxidação, alquilação ou desaminação que resultam em alteração na estrutura do nucleotídeo que não são capazes de causar distorções na molécula de DNA. O reparo por excisão de bases reconhece a base modificada, cliva a posição na qual esta base se encontra gerando um sítioapurínico. Este sítio será depois removido permitindo que uma DNA polimerase seja capaz de restaurar a fita com base na homologia da fita complementar (Hoeijmakers 2001).

O reparo por excisão de nucleotídeos é capaz de lidar com lesões de diversas fontes, mas que causem distorções na dupla fita do DNA. Ele pode ser dividido em duas vias principais: o reparo global do genoma e o reparo acoplado à transcrição (Marteijn et al. 2014). A versatilidade do NER se dá pelo fato da via ser capaz de reconhecer as consequências das lesões, focando-se em características comuns à elas, como a capacidade de distorcer a dupla hélice. Um dos principais sinais para a ativação do NER é justamente a parada da RNA polimerase no processo de transcrição.

Bases erroneamente incorporadas também podem ser capazes de gerar mutações caso não sejam corretamente reparadas. Para lidar com estas situações, o reparo por erro de pareamento (MMR do inglês mismatch repair) é acionado para evitar a geração destas mutações. Células que possuem problemas na via de reparo por erro de pareamento apresentam um aumento significativo em sua taxa de mutação (Li 2008).

Por fim, quebras duplas que possam ser causadas por agentes externos possuem, em eucariotos superiores, duas vias de reparo preferenciais: o reparo por recombinação homóloga (HRR, do inglês homologous recombination repair) e a junção de pontas não-homólogas (NHEJ, do inglês non-homologous end joining) (Hoeijmakers 2001). A via de reparo NHEJ é susceptível a erros, porém é a via mais comum para lidar com estas quebras em eucariotos multicelulares. Esta via envolve modificações nas duas pontas da quebra para torná-las compatíveis para que possam ser reconectadas. Essa via, porém, pode levar à perda da informação contida na região da quebra (Lieber et al. 2003). A recombinação homóloga é uma via presente nos organismos que é capaz de reparar danos ao DNA de uma forma dependente de um molde. O reparo realizado por esta via é de alta fidelidade e, além do reparo de DNA, este processo possui papel fundamental em outros processos do metabolismo como a meiose e a mitose (Heyer 2007). A escolha da via para lidar com a quebra dupla parece estar relacionada com a presença ou não de uma segunda cópia idêntica do local lesionado. A falta de uma cópia para a homologia necessária ao reestabelecimento da informação perdida no local da quebra, leva o organismo a optar pela via NHEJ (Hoeijmakers 2001).

Alguns organismos possuem vias de reversão direta, na qual enzimas são capazes de lidar diretamente com a lesão ou modificação e revertê-la sem a necessidade de molde ou de incisão de uma porção da molécula de DNA. Um exemplo destas vias de reversão direta é a fotorreativação enzimática promovida pela fotoliase. Esta enzima é capaz de, na presença de luz, reverter fotoprodutos causados pela exposição à luz ultravioleta (Eker et al. 2009). Em última instância, as células possuem também mecanismo de tolerância ao dano que permitem que o ciclo celular progrida mesmo sem o reparo eficaz da lesão. Muitas das lesões que escapam das vias de reparo ainda possuem o potencial de bloquear a replicação das DNA polimerases convencionais. Para evitar que estes danos sejam capazes de impedir a progressão do ciclo celular, as células possuem mecanismos que permitam sua sobrevivência. Um exemplo destes mecanismos são as polimerases de síntese translesão da família Y. Estas DNA polimerases possuem sítios ativos mais permissivos que são capazes de permitir a incorporação de bases modificadas ou em pareamento distintos dos esperados. Apesar do potencial de gerar mutações que estas polimerases possuem, elas são um mecanismo SOS que permite que a replicação seja completada, mesmo na presença de bases modificadas ou erros na molécula de DNA (Prakash et al. 2005).

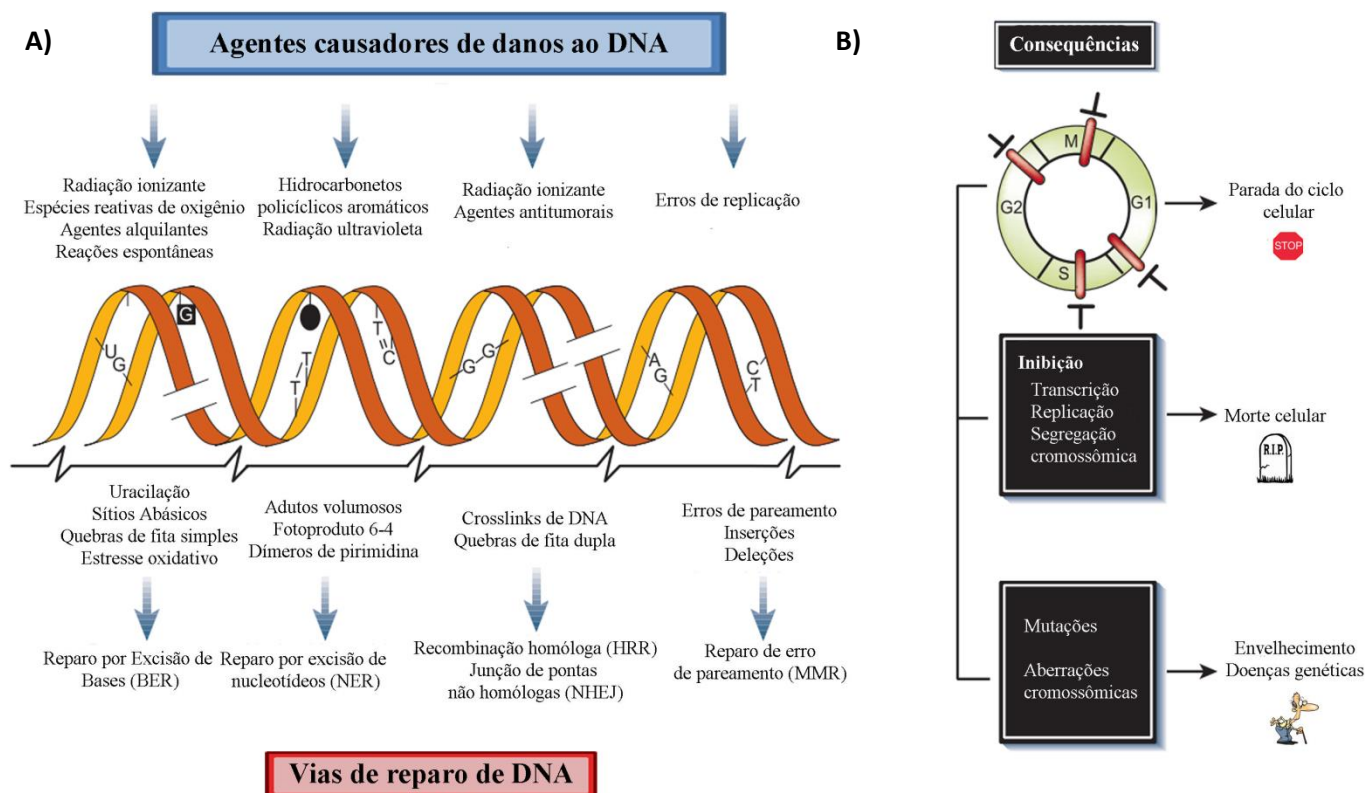


Figura 4 - Fontes de danos ao DNA e suas vias de reparo – Diversos tipos de agentes podem causar danos à molécula de DNA. A) Na porção superior alguns dos mais comuns tipos de agentes causadores de danos ao DNA. Estes agentes são tanto de fontes exógenas (como a radiação ionizante) como resultado do metabolismo do organismo (como as espécies reativas de oxigênio). Na porção mediana temos alguns dos principais efeitos destes agentes, como quebras de fitas simples, dupla, formação de dímeros, sítios abásicos, inserções, deleções e modificações de base. Na porção inferior temos as vias de reparo responsáveis pelo reparo de cada uma destas lesões e danos a molécula de DNA. B) As principais consequências decorrentes do dano ao DNA, como a parada do ciclo celular, ativação de vias de morte celular e, a longo prazo, envelhecimento e surgimento de algumas doenças genéticas. Cada um destes efeitos vai depender do tipo de dano e via de reparo afetada durante o processo de reparo (Modificado de Hoeijmakers 2001)

1.4. Efeitos da radiação ionizante

Os organismos estão continuamente sendo expostos à radiação eletromagnética de fontes tanto naturais quanto artificiais e a radiação ionizante foi o primeiro fator ambiental a ser descrito como tendo potencial mutagênico (Breimer 1988). A radiação espacial, por exemplo, é capaz de transferir energia e causar modificações em biomoléculas que podem ser nocivas à saúde dos organismos. As doses que podem ser letais variam muito entre cada organismo e tecido em questão. Células humanas em cultura podem sentir os efeitos da radiação ionizante em doses tão pequenas quanto 4 Gy (Yonetani et al. 2005), ao passo que organismos extremos, como a bactéria *Deinococcus radiodurans*, resiste doses superiores à 15KGy (Liu et al. 2003).

O efeito biológico da radiação ionizante se dá a partir da interação entre os átomos e moléculas da célula. A radiação ionizante são feixes de radiação eletromagnética que possuem partículas com potencial de transferência de energia, como elétrons e fótons de alta energia. Existem várias consequências à exposição à radiação ionizante, tanto somático quanto hereditários, porém dois efeitos principais são ditos como causadores e importantes na avaliação destas consequências: geração de espécies reativas de oxigênio e geração de quebras de fitas dupla no DNA (Unscear 2010a).

A absorção de radiação eletromagnética por um tecido é decorrente da excitabilidade dos elétrons de suas moléculas. Essa excitabilidade é dependente do tipo de onda utilizada durante a exposição. Ao penetrar por uma célula ou tecido, as colisões entre as ondas e as moléculas causam alterações nestas últimas. O feixe de radiação incidente é capaz de transmitir energia às moléculas que encontra durante seu trajeto, alterando o estado de excitabilidade delas e gerando tanto quebra de algumas (como o DNA) quanto modificações em outras (espécies reativas de oxigênio, a partir da decomposição radiolítica da água) (Unscear 2010b). Estas alterações são resultado da taxa de transferência linear de energia de uma onda. Ondas de alta transferência linear de energia (HLET do inglês “high linear energy transfer”), como as partículas α , possuem efeitos diversos das ondas com baixa energia linear de transferência (raios γ). Estes efeitos se devem a capacidade das ondas HLET de transferir muito mais energia às moléculas que encontra (Xue et al. 2015).

Dentre todos os efeitos decorrentes da exposição à radiação, a quebra de fitas duplas de DNA causada pela radiação ionizante é o foco deste trabalho. Como já foi dito, para lidar com estas quebras duas vias de reparo podem ser acionadas: junção de extremidades não-homólogas e o reparo por recombinação homóloga. A escolha de qual via será acionada envolve vários fatores distintos, como a expressão de proteínas que inibam ou promovam qualquer uma das vias (como antirecombinases e proteínas de sinalização), estrutura da cromatina, local de ocorrência da quebra na dupla fita e fase do ciclo celular (Chapman et al. 2012).

Em *Trypanosoma cruzi*, a falta de proteínas essenciais às etapas finais do reparo por junção de extremidades não homólogas (como as proteínas DNA ligase IV e XRCC4), juntamente com o fato de que mutantes para as proteínas Ku70 e Ku80, essenciais à via, não apresentam maior sensibilidade à agentes causadores de quebra de fita dupla, permitem inferir que esta via não é responsável pelo reparo de quebras de fita duplas em tripanossomatídeos (Passos-Silva et al. 2010).

1.5. Reparo de quebra de fitas duplas

1.5.1.Reparo por recombinação homóloga

Processos de recombinação são encontrados em todos os organismos. O processo de recombinação homóloga é uma via de metabolismo de DNA que é capaz de reparar, com alta fidelidade, quebras de fita dupla a partir de um molde. Devido à isto, esta via é fundamental na manutenção da estabilidade genômica, ao mesmo tempo que também está envolvida com a geração de variabilidade (Heyer 2007). Além do processo de reparo, a recombinação homóloga também possui papel em outros processos metabólicos, como a segregação correta de cromossomos durante a meiose (Heyer et al. 2010), manutenção dos telômeros (Li & Heyer 2008), além de impedir que forquilhas de replicação que encontrem quebras sejam desfeitas (Sung & Klein 2006).

O processo de recombinação homóloga é complexo, e pode ser dividido em três etapas: pré-sinapse, sinapse e pós-sinapse (Figura 5). A primeira destas etapas, a pré sinapse, ocorre quando as pontas da quebra de fita dupla são reconhecidas e passam pelo processamento à 3'-OH, gerando filamentos de cauda de fita simples em cada uma das fitas quebradas. Após esta quebra e ressecção destes filamentos, começa a sinapse, que é o processo de invasão da fita de DNA a ser reparada em seu molde de reparo no cromossomo homólogo. Esta invasão resulta em uma estrutura chamada de D-loop. Após esta invasão ocorre a síntese desta região para reestabelecer a informação ali presente, e três caminhos de resolução são possíveis durante a pós sinapse (destacadas na figura 5)(Renkawitz et al. 2014; Li & Heyer 2008):

- A via de síntese dependente de anelamento da fita (SDSA do inglês synthesis-dependent strand annealing) ocorre quando a fita invasora é liberada e anelada novamente na segunda extremidade da fita originalmente lesionada. Nesta via de resolução não ocorre troca e recombinação entre os cromossomos homólogos. O processo de SDSA pode ser resultado de várias tentativas de invasão e anelamento, embora não esteja claro as razões destas múltiplas tentativas(Heyer et al. 2010).
- A replicação induzida por quebra (BIR do inglês break induced replication) ocorre quando o D-loop é formado próximo à uma forquilha de replicação completa. Dessa forma, durante o processo de síntese, toda a porção distal do cromossomo é replicado e na resolução ocorre perda da heterozigosidade.

Esta resolução tem sua importância durante os processos de manutenção do telômero (Heyer 2007).

- A via de reparo de quebras de fitas duplas (DSBR do inglês double-strand break repair) permite maior variedade durante as resoluções. Nesta via, as duas extremidades da quebra dupla estão envolvidas, seja por invasão independente ou pela captura da segunda extremidade da fita. Neste processo, após a formação do D-loop e síntese da porção danificada, a junção formada pode gerar produtos em que ocorreram crossing ou não. Caso uma das fitas seja conectada apenas em uma das extremidades, ocorre a troca da porção distal de um dos cromossomos, resultando em um produto com crossing over. Caso a junção seja resolvida pelo mecanismo de dissolução catalisado pela TopoIIIα ou pelo mecanismo mediado pela helicase BLM) o produto gerado não possui crossover (Li & Heyer 2008).

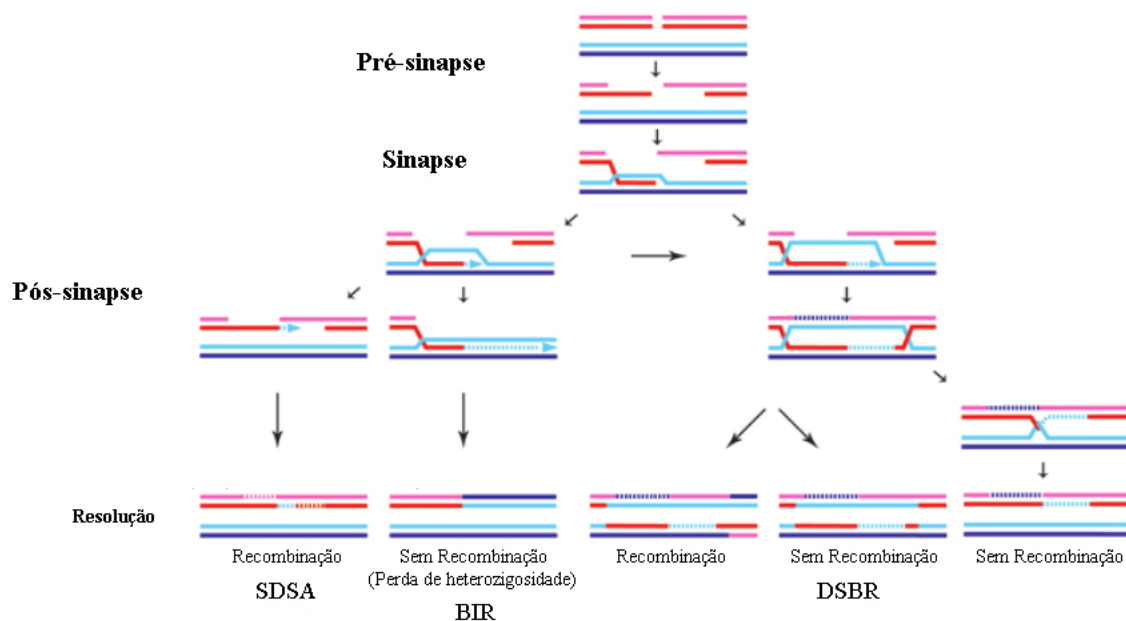


Figura 5 - O processo de reparo por recombinação homóloga – O esquema mostra, de forma simplificada, o processo de reparo por recombinação homóloga que pode ser dividido em três etapas: a pré-sinapse, na qual o ponto da quebra de fita dupla é reconhecido e ocorre a ressecção da molécula de DNA, gerando filamentos de fita simples em um cromossomo; sinapse, quando ocorre a invasão das extremidades de fita simples no cromossomo homólogo para a busca da homologia e síntese de DNA para o reparo; pós-sinapse, quando os D-loops formados durante a sinapse serão resolvidos, de três formas distintas. Na primeira resolução, a síntese dependente de anelamento (SDSA) ocorre a junção da região recém-sintetizada na outra extremidade da fita originalmente lesionada. A segunda forma de resolução (replicação induzida por quebra) é resultado do ponto de quebra estar próximo à uma forquilha de replicação. Durante a síntese para o reparo, a forquilha acaba ocasionando a síntese de toda a porção distal do cromossomo, resultando em perda de heterozigidade, apesar de um produto sem recombinação. A terceira forma de resolução envolve as duas fitas. O processo de invasão ou de captura da extremidade de ambas as fitas resulta em um D-loop duplo, nos quais uma resolvase pode atuar gerando tanto produtos recombinantes quanto não recombinantes. (Adaptado de Li & Heyer, 2008)

A recombinação homóloga, juntamente com a junção de pontas não homólogas, são os mecanismos de reparo envolvidos no trato de quebras de fitas dupla (como as geradas por agentes intercalantes e a radiação ionizante (Kanaar et al. 1998; Breimer 1988; Hoeijmakers 2001). Os mecanismos de escolha de resolução ainda começam a ser elucidados. Experimentos em leveduras demonstraram que a via de síntese dependente de anelamento, juntamente com a replicação induzida por quebra estão envolvidas durante o reparo mitótico, porém a replicação induzida por quebra ocorre com menos frequência devido à sua lentidão. Existem também proteínas que podem suprimir esta via. O posicionamento da quebra (se próximo ou não da forquilha de replicação) também é importante para a escolha da via de resolução (Heyer et al. 2010).

O primeiro passo do processo é o reconhecimento do dano e sinalização para a maquinaria de reparo. Dois sistemas de sinalização parecem controlar a atividade da recombinação homóloga: a resposta ao dano ao DNA e a maquinaria de controle do ciclo celular. (Heyer et al. 2010) O ciclo celular é de fundamental importância para as vias de reparo de DNA. Durante as fases S e início de G2 do ciclo celular, o processo de recombinação homólogo é favorecido. Apesar de não serem conhecidos os motivos e mecanismos exatos para tal comportamento, é sugerido que a atuação a partir da atuação de cinases específicas, ocorre a modulação das proteínas da recombinação homóloga de forma positiva ou negativa, a partir de fosforilação e desfosforilação, levando ao controle específico do processo de recombinação em fases específicas do ciclo celular (Esashi et al. 2005). A disponibilidade de cromátides irmãs também explica a maior ativação da via durante estas fases do ciclo celular. De forma geral, a resposta ao dano ao DNA, mediada por ATM e ATR, leva à sinalização para o processo de recombinação homóloga. Durante o processo, a presença do filamento de fita simples durante a pré-sinapse estimula esta resposta, levando à modificações pós-traducionais das proteínas desta via. Esta resposta pode levar à uma parada ou alteração do ciclo celular que em muitos organismos pode ser conseguida a partir da modificação de cinases específicas, demonstrando que o processo de recombinação é regulado a partir da interação de várias proteínas e vias distintas. (Heyer et al. 2010).

1.5.2. Mecanismos moleculares da recombinação homóloga

O início do processo de recombinação depende da ressecção das regiões de quebra para gerar os filamentos de fita simples durante a pré-sinapse. Esta ressecção é feita pelo complexo MRN, formado pelas proteínas Rad50-Mre11-NBS1 (alguns organismos possuem complexos distintos, mas com uma função semelhante, como *Saccharomyces cerevisiae*,

que utiliza as nucleases Mre11-Rad50-Xrs2) (Mimitou & Symington 2009). O complexo MRN possui diferentes e importantes funções além da ressecção da dupla fita no local de quebra. Uma das principais funções está na sinalização após a exposição a agentes como a radiação ionizante. Durante o processo de resposta ao dano de DNA, ATM fosforila o complexo MRN em vários resíduos da proteína NBS1, permitindo sua ativação (Zhou & Elledge 2000).

Após a atuação do complexo MRN são gerados filamentos de fitas simples. A proteína RPA é então capaz de interagir com estes filamentos, conservando sua conformação de fita simples. (Fanning et al. 2006). Além de manter a conformação de fita simples, essencial à continuidade da recombinação para a invasão em busca de homologia, ela também atua na sinalização pela via de ATR. Sendo um ponto de escolha de qual via de metabolismo de DNA será acionada, como a via de síntese translesão, regressão da forquilha de replicação e a própria recombinação homóloga. Esta escolha é dependente de modificações pós-traducionais na própria RPA (como fosforilação de subunidades específicas) além de sinais metabólicos da própria célula, como a sinalização por cinases específicas (Heyer et al. 2010).

A função central do processo é realizada pela proteína Rad51, homóloga à proteína RecA de procariotos (Kowalczykowski et al. 1994): a invasão dos filamentos de fita simples e a busca por homologia. A proteína Rad51 forma um filamento nucleoproteico com as porções de DNA fita simples, promove a invasão dos mesmos nas cromátides irmãs e a procura de homologia. Esta procura é o papel crucial de todo o processo, pois é ele que permite a fidelidade do reparo (Wong et al. 1997). Apesar de Rad51 possuir menor afinidade com filamentos de fita simples de DNA que a proteína RPA, ela é auxiliada por outras proteínas durante seu carregamento, permitindo o deslocamento correto de RPA e sua substituição por Rad51. O filamento nucleoproteico formado então por Rad51-ssDNA, possui um outro sítio de afinidade para o reconhecimento de um dúplex de DNA, a ser encontrado na cromátide irmã (Heyer 2007).

O carregamento da proteína Rad51 é, portanto, o ponto chave para o sucesso do processo de recombinação, porém ele depende de mediação, já que RPA possui maior afinidade pelo filamento de DNA de fita simples. Apesar de algumas vias distintas para a ligação de Rad51 ao filamento de ssDNA terem sido descritas em variados organismos (Li & Heyer 2008; Yonetani et al. 2005), uma proteína chave no processo é a proteína BRCA2.

A proteína BRCA2 possui, em sua estrutura, motivos específicos de ligação à oligômeros de Rad51 existentes no nucleoplasma. Estes motivos são capazes de desfazer a ligação do oligômero e se ligarem a um monômero de Rad51. Após isso, a proteína BRCA2

é capaz de catalisar o carregamento destes monômeros ao filamento de ssDNA. É esta estrutura que existe durante o início do processo de invasão. (Lord & Ashworth 2007; Pellegrini et al. 2002). Os controles da função de BRCA2 ainda começam a ser investigados, porém sabe-se que esta proteína sofre repressão a partir da fosforilação de resíduos específicos em seu motivo de ligação à Rad51 e é dependente da fase do ciclo celular (Heyer et al. 2010).

A interação entre BRCA2 e Rad51 é mediada por repetições com motivos específicos chamados BRC. Estes motivos específicos que são responsáveis pela desestabilização dos oligômeros de Rad51 e carregamento da proteína ao filamento de DNA a ser reparado (Lord & Ashworth 2007). Estes motivos são capazes de se ligar à um monômero de Rad51, ainda inativo, através de repetições conservadas de duas sequências de aminoácidos: FSTA e LVDE. Com a ocorrência do dano ao DNA, a cascata de sinalização causa uma desfosforilação em BRCA2, ativando o complexo com Rad51, por enfraquecer a ligação com os motivos BRC e permitir a formação do filamento nucleoprotéico de Rad51 com a fita de DNA. Com esta ativação ocorre o início do processo de invasão para o reparo. Após o processo de reparo ter sido concluído, BRCA2 é novamente fosforilada, permitindo novamente a ligação com os motivos BRC. Não se sabe se Rad51 permanece novamente ligada à BRCA2 ou se todo o processo de desestabilização de oligômeros precisa novamente ocorrer. (Gudmundsdottir & Ashworth 2006; Lord & Ashworth 2007). O número de motivos BRC é variado entre os organismos e muitas vezes entre populações distintas e não é conhecido o motivo desta variação. O maior número de motivos BRC poderia controlar os níveis de monômeros de Rad51 disponíveis para se ligar ao filamento de fita simples. (Pellegrini et al. 2002)

Formado a estrutura Rad51-ssDNA ocorre o processo de invasão com a formação do D-loop e procura da homologia. Apesar do mecanismo exato da procura por homologia não ser completamente elucidado, sabe-se que vários fatores determinam o sucesso deste processo, como fosforilações na própria Rad51, a interação desta com outras proteínas, e até mesmo o envolvimento da via de reparo por erro de pareamento para garantir a região homóloga correta (Heyer et al. 2010). Caso a homologia não seja encontrada, a estrutura de recombinação montada, com a fita simples invadindo e deslocando a fita dupla, é desmontada e a fita dupla é liberada para o anelamento (Hoeijmakers 2001). O final do processo de recombinação dependerá da atuação de proteínas antirecombinases. De forma geral, estas proteínas sofrem modificações pós-traducionais, como ubiquitinação, sumoilação e fosforilação. O tipo de modificação pós-traducional, o local do ponto de quebra, e eventos de sinalização celular, permitem a resolução dos D-loops com a ocorrência de eventos de crossing ou não (Li & Heyer 2008; Heyer et al. 2010).

1.5.3. Reparo de quebra de fita dupla em tripanossomatídeos

O sequenciamento dos tripanossomatídeos permitiu a identificação por similaridade de proteínas envolvidas com o reparo de DNA. Com os primeiros genomas sequenciados foi demonstrado que representantes dos três grupos principais dos tripanossomatídeos (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*) possuem as principais enzimas envolvidas no reparo por recombinação homóloga (Passos-Silva et al. 2010). Alguns trabalhos já foram desenvolvidos e mostraram que alterações envolvendo estas proteínas levam a fenótipos distintos. Em *Trypanosoma brucei* a presença de mutações na proteína Mre11 prejudicam a capacidade de reparo por recombinação homóloga do parasito (Tan et al. 2002).

Uma das características que chama a atenção em *Trypanosoma cruzi* é a ausência de determinados parálogos de Rad51 que são encontrados em outros organismos como leveduras (Passos-Silva et al. 2010; Wu et al. 2008). A ausência de Rad52 pode ser compensada por certas proteínas em determinados organismos, entre elas a proteína BRCA2 (Fortin & Symington 2002; Samach et al. 2011) que é encontrada nos tripanossomatídeos. A proteína BRCA2 possui características distintas entre os grupos de tripanossomatídeos. Em *Trypanosoma brucei* esta proteína possui uma alta repetição de seus motivos BRC, possuindo 15 no total, ao passo que *T. cruzi* e *Leishmania* possuem apenas duas. Apesar da função específica de cada motivo não ser estabelecida, é sugerido que o aumento na complexidade dos organismos poderia estar relacionado com um controle fino dos processos de recombinação e, portanto, o maior número de motivos BRC estaria relacionado com o controle mais preciso da função de Rad51 (Hartley & McCulloch 2008; Lo et al. 2003). Porém, o motivo para esta grande variação no número de motivos entre organismos tão próximos não é claro.

Em todos os três grandes grupos de tripanossomatídeos a proteína Rad51 está presente (Passos-Silva et al. 2010). Em *Trypanosoma brucei*, Rad51 foi caracterizada e foi demonstrado que sua inativação é capaz de prejudicar a capacidade de troca de VSG's do parasito (McCulloch & Barry 1999). Também já foi estabelecido a importância de recombinases para o reparo de DNA. Em *L. major* foi demonstrado que Rad51 está envolvida com o reparo de danos causados por fleomicina, capaz de gerar quebras de fita dupla. Estudos com *L. major* não foram capazes de detectar níveis relevantes de Rad51 em culturas não exposta a estresse genotóxico, porém o tratamento com fleomicina produziu altos níveis do mRNA de Rad51, implicando a proteína na resposta à danos ao DNA (McKean et al. 2001).

Em *Trypanosoma cruzi* a caracterização da proteína Rad51 levou a resultados semelhantes ao visto para outros organismos. Sua expressão é inferida em todas as formas de vida do parasito e é implicada com a geração de quebras na fita de DNA. Após exposição à radiação ionizante, os níveis de mRNA para Rad51 são aumentados no parasito (cerca de 2 vezes mais abundantes 24 horas após a exposição quando comparado com a cepa não irradiada), demonstrando sua importância para o processo de reparo de quebras de fita dupla. Foi demonstrado, também, que o reparo é feito em até 48 horas após a irradiação, mesmo que as populações permaneçam sem crescimento aparente por cerca de 10 dias (Regis-da-Silva et al. 2006). Foi demonstrado a superexpressão de RAD51, em culturas expostas à radiação ionizante, leva à um reparo de quebras de fita dupla mais eficiente e uma recuperação mais rápida do crescimento quando comparado com uma cepa selvagem (Regis-da-Silva et al. 2006).

A própria história evolutiva do táxon *Trypanosoma cruzi* envolve eventos de recombinação e geração de híbridos (Baptista et al. 2014). Dessa forma, tendo em vista o que já se encontra sobre a resposta contra radiação ionizante em *Trypanosoma cruzi*, nosso trabalho tem como objetivo estudar possíveis diferenças na resposta de populações distintas de *Trypanosoma cruzi* quando expostas a irradiação por raios γ , a partir da comparação de características de populações híbridas e ancestrais do parasito.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar possíveis diferenças na resposta à quebra de fitas duplas de DNA causadas pela exposição à radiação ionizante de diferentes linhagens taxonômicas de *Trypanosoma cruzi*

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o fenótipo de retomada de crescimento destas diferentes linhagens quando expostas à uma dose total de 500Gy de radiação ionizante.
- Analisar por ferramentas de bioinformática os principais genes envolvidos no reparo das quebras de fitas duplas
- Analisar a sequência e os domínios funcionais de cada uma destas proteínas
- Analisar, a partir de predição por homologia, a estrutura das proteínas Rad51 e BRCA2
- Realizar a predição, *in silico*, da interação entre as proteínas Rad51 e BRCA2 de cada uma destas proteínas
- Avaliar a expressão dos principais genes envolvidos no reparo por quebra de fitas dupla presentes nestas linhagens.

3. Metodologia

3.1. Células e meio de cultura

Foram utilizados quatro cepas representantes de diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi*: CI Brener (DTU T. cruzi VI), Silvio X10 (DTU T. cruzi I), Esmeraldo (DTU T. cruzi II) e 231 (DTU T. cruzi III) cedidas pelo laboratório do professor Égler Chiari do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. A confirmação das linhagens foi feita através de tipagem das células em nosso laboratório utilizando o rDNA 24Sα em uma reação de PCR e depois corridos em gel de acrilamida (SOUTO, et al., 1996). As culturas foram mantidas à 28°C por passagem regulares em meio 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), esterilizado por autoclavagem e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ao meio também foram acrescentados penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg.mL⁻¹).

3.2. Predição de estrutura por modelagem

As sequências dos genes em estudo foram recuperadas do banco de dados Trytrypdb (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) através do programa BLAST, utilizando o algoritmo BLASTp, contra a base de dados RSCB Protein Data Bank. Foram recuperadas estruturas depositadas que possuíam similaridade. A melhor estrutura escolhida, a partir da identidade com a sequência desejada foi então utilizada como modelo para a geração das estruturas tridimensionais preditas a partir do programa MODELLER 9.10 (Eswar et al. 2007).

O programa MODELLER 9.10 permite a geração de modelos a partir de homologia e restrições espaciais. Foram gerados 1000 modelos para cada sequência com o programa MODELLER 9.10, utilizando o algoritmo para modelagem por homologia. Os melhores modelos foram escolhidos a partir dos valores de DOPE e GA341 gerados pelo próprio Modeller 9.10. Os modelos foram validados a partir da análise no PROCHECK para gerar o gráfico de energias de Ramachandran (Laskowski et al. 1993). Os modelos considerados como válidos possuem um total de resíduos em regiões permitidas e favorecidas de mais de 90%. As imagens foram sobrepostas e tratadas com o programa ICM Browser (MolSOFT) para destacar os polimorfismos e semelhanças estruturais usando como padrão a comparação com o melhor modelo gerado para a cepa CI Brener. As medidas de distância utilizadas para validar as sobreposições foram o RMSD (random median square deviation) e

o TM-score gerado pelo programa TM-align que permite uma validação levando em consideração, além da distância entre os carbonos do esqueleto da proteína, a distância das proteínas, o número de resíduos equivalentes e a probabilidade de duas proteínas com estruturas similares serem resultado de enovelamento aleatório (Zhang & Skolnick 2005; Xu & Zhang 2010). Modelos com TM-score entre 0,5 e 1 são considerados como não tendo similaridade estrutural aleatória.

3.3. Docking

A análise de interação foi feita utilizando o servidor online HADDOCK(High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing) (de Vries et al. 2010). O HADDOCK é um servidor online que permite a análise de interação entre duas moléculas de forma flexível. Ao contrário de métodos de docking *ab initio*, o HADDOCK é capaz de considerar alterações estruturais ou dados experimentais obtidos anteriormente para dirigir as estruturas de forma a melhorar a sua capacidade de previsão, a partir da determinação de resíduos ativos (que são tidos como necessários para a interação entre as proteínas) e resíduos passivos (que podem ou não fazer contato entre as duas proteínas).

Para o procedimento foram escolhidos os melhores modelos das proteínas BRCA2 e Rad51 para as três cepas. Afim de obter um resultado com todas as melhores possibilidades foram definidos como resíduos ativos aqueles que poderiam estar inicialmente acessíveis para a interação (além dos aminoácidos dos domínios identificados em análises prévias). Todos os outros resíduos foram permitidos como sendo passivos para a interação. Os modelos de docking foram então ranqueados de acordo com os parâmetros do próprio programa.

3.4. Irradiação de células

Garrafas de cultura com parasitos na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento foram acompanhadas por cerca de duas semanas, diluídas à uma concentração de 1×10^7 células.mL⁻¹ em meio LIT suplementado com soro fetal bovino e então irradiadas. Para todos os experimentos, garrafas contendo 15mL de parasitos foram expostos à uma dose de 500Gy de radiação gama provenientes de uma fonte do isótopo sintético radioativo de cobalto 60 (60Co) presente no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CNEN/CDTN). A utilização da dose total de 500Gy foi determinada de acordo com trabalhos prévios (Regis-da-Silva et al. 2006). A exposição foi feita à uma taxa de dose de 1500Gy/h durante 20 minutos, à um raio de

20cm da fonte. Após a irradiação estas células foram utilizadas para a extração de RNA e contagem das curvas de crescimento. Todos os controles também foram levados ao CDTN, porém não foram irradiados.

3.5. Curva de crescimento

Culturas em fase exponencial de crescimento foram submetidas à irradiação como descrito acima. O crescimento das células foi acompanhado a partir da contagem de células vivas em câmara citométrica utilizando-se o corante vital eritrosina. A densidade celular foi acompanhada até que todas as culturas atingissem seu platô de crescimento e então os grupos foram comparados.

Os ensaios foram feitos em placas de seis poços em triplicatas. Após a exposição à radiação ionizante o volume total de 15mL foi dividido nas triplicatas para a contagem. Cada poço apresenta inicialmente 5mL de cultura de cada uma das respectivas linhagens de *Trypanosoma cruzi* à uma densidade de 1×10^7 células.mL⁻¹. As placas foram vedadas e o meio não foi trocado durante toda a curva de crescimento.

Para o estudo dos efeitos da presença de cafeína para as células em estudo, 5mM de cafeína dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado às culturas em estudo 1 hora antes da irradiação e 1 hora após a irradiação. Todas as células expostas à cafeína foram centrifugadas (5.000G, 5 minutos) e lavadas duas vezes com PBS 1X em tempos específicos e depois ressuspensas na mesma quantidade de meio LIT suplementado com soro fetal bovino. Após isto estas células foram distribuídas em placas de seis poços e seu crescimento foi acompanhado como já foi descrito. Como controle foram utilizadas células não expostas a radiação, e células não expostas à radiação e com a adição de DMSO ao meio.

3.6. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para determinar os níveis de transcrição dos genes Rad51 e BRCA2 das diferentes cepas utilizadas no trabalho foi realizada PCR quantitativa em tempo real. Culturas irradiadas e não irradiadas das cepas CI Brener, Silvio e Esmeraldo tiveram seu RNA extraído nos tempos 0h, 24h e 48h para culturas irradiadas e não irradiadas. As culturas foram contadas em câmara citométrica utilizando o corante vital eritrosina e cerca de 1×10^8 células de cada cepa de parasito foram centrifugadas à 3000g por 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado em 1mL de TRIzol e incubados por 5 minutos à

temperatura ambiente. Após o processo de lise pelo TRIzol, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao lisado e este foi misturado por inversão e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados à 13.500G por 15 minutos, à 4°C, para a separação de fases. Após isto, a fase incolor, contendo o RNA, foi coletada e o restante descartado. Esta fase incolor foi incubada com isopropanol e incubada por uma hora à -20°C. Após isso, foi centrifugado à 13.500G, por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante descartado. O pellet de RNA passou então por duas lavagens com 1mL de etanol 75% (7500G, 5 minutos, 4°C), o sobrenadante descartado e o tubo foi deixado para secar o excesso de etanol residual. O RNA foi, por fim, ressuspensionado em 60µL de H₂O MiliQ e dosado para a síntese de cDNA.

Após a verificação da integridade do RNA, feita a partir de corrida em gel de agarose 1% contendo formaldeído, cada amostra de RNA foi tratada com DNase para remoção de contaminação por DNA genômico. As amostras de RNA extraídas foram quantificadas no aparelho NanoDrop ND-100 UV/Vis (NanoDrop Technologies, USA) e 10µg totais de cada amostra foram tratadas de acordo com as recomendações do fabricante do kit *DNA free Kit* (Ambion). As amostras foram posteriormente submetidas à reações de PCR para confirmar a eficácia do tratamento e eliminação de DNA genômico. As reações para a síntese de cDNA foram realizadas utilizando-se 1µg das amostras de RNA tratados com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.7. PCR em Tempo Real

Os genes BRCA2 e Rad51 foram escolhidos para análise pela RT-(q)PCR devido à sua importância para o início do processo de recombinação homóloga. Iniciadores para a PCR em tempo real foram obtidos de trabalhos anteriores para o gene Rad51 (Regis-da-Silva et al. 2006) e para o gene GAPDH (Araújo et al. 2011). Para o gene BRCA2 os iniciadores foram desenhados utilizando-se o software *GenScript Real-Time PCR (TaqMan) Primer Design*. Estas sequências foram alinhadas com os genes de cada cepa e analisadas através do BLASTN para confirmar sua especificidade. As sequências dos iniciadores utilizados está na tabela 1.

As reações de PCR quantitativa em Tempo Real foram feitas utilizando-se o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) como sistema de detecção de acordo com as recomendações do fabricante. As eficiências de cada primer foram testadas a partir da diluição seriada do cDNA obtido das cepas não irradiadas e foram consideradas

eficiências entre 90% e 110%. Os resultados foram obtidos em placas de 384 poços no aparelho 7900HT Fast *Real-Time* PCR System (Applied Biosystems). Todas reações foram feitas em triplicata, utilizando-se 2ng de cDNA, 300nM de cada iniciador, 5μL de Mix SYBR 2X e água DNA RNase free para completar o volume de 10μL para cada reação. As reações foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade e Ecologia Molecular – LBEM/UFMG. O seguinte programa foi utilizado nas reações: dois passos iniciais de 50°C por 2 minutos, um passo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. Os níveis de transcrição foram obtidos a partir da comparação das cepas Silvio e Esmeraldo com a cepa Cl Brener (já utilizada em outros estudos de irradiação ionizante) e da comparação entre as culturas irradiadas e não irradiadas. Após as reações, foi feita a análise da curva de dissociação dos produtos amplificados de cada amostra para verificar se as reações estavam produzindo mais de um produto ou se havia formação de dímeros. Os resultados foram normalizados utilizando-se GAPDH como gene constitutivo. Os resultados de transcrição relativa foram obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism v5.0 e os testes t de student e One Way ANOVA.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a PCR em Tempo Real

Iniciador	Identificador do gene	Sequência
RTTcRad51Fw RTTcRad51Rev	TcCLB.508817.50	5' – GGC TGT CAA GGG TAT CAG TG – 3' 5' – AAC CAC TGC GGA TGT AA GC – 3'
RTEsmBRCA2Fw RTEsmBRCA2Rev	TcCLB.511417.120	GTGCCCCCAGGTCCTT CGATAATCCACGAAGTTTCAACAA
RTSylBRCA2Fw RTSylBRCA2Rev	TCSYLVIO_007238	GTGTCCTCCAGGTCCTTCCA CGATAATCCACGAAGTTTCAACAA
RTCIBRCA2FW RTCIBRCA2Rev	TcCLB.505999.40	TCGCTGCGGGCATAAGTTAT ACCGGTCGCGTACAGTTGTAA
RT gGAPDH2 for RT gGAPDH2 ver	TcCLB.506943.50	5'-CGGTGGACGGTGTGTCGGTG-3' 5'-CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG-3'

4. Resultados

4.1. Avaliação da resposta à radiação ionizante de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

A exposição à radiação ionizante é uma forma de se causar quebras na dupla fita de DNA. Como fenótipo à esta exposição, a cepa CI Brener do parasito *Trypanosoma cruzi* apresenta uma parada no crescimento de cerca de 10 dias, momento no qual o parasito retoma seu crescimento (Regis-da-Silva et al. 2006). CI Brener é uma cepa híbrida, pertencente à linhagem T. cruzi VI que, como já foi dito, é resultado de algum evento de hibridização entre duas linhagens ancestrais (Baptista et al. 2014; Zingales et al. 2012). Visando investigar se a resposta à radiação que CI Brener apresenta poderia estar relacionada com sua característica híbrida, foram realizados ensaios comparando a resposta desta cepa à duas cepas representantes de linhagens ancestrais.

Como linhagens ancestrais inicialmente foram escolhidas para o estudo a cepa Silvio (representante da DTU T. cruzi I) e a cepa Esmeraldo (representante da linhagem DTU T. cruzi II). Estas três cepas foram irradiadas no Laboratório de Irradiação Gama do CDTN como já descrito. Verificou-se que o tempo de resposta destas linhagens é diferente quando analisado o tempo de retomada do crescimento após a exposição à radiação ionizante (Figura 6).

Observando o gráfico da Figura 6, verifica-se que, após a irradiação, todas as cepas não se dividem por um longo período. Período este maior que o já relatado como o tempo de 48 horas para que todo o DNA seja reparado (Regis-da-Silva et al. 2006). Porém, chama a atenção o fato das cepas de linhagens ancestrais apresentarem um tempo para a retomada de crescimento superior ao da cepa híbrida CI Brener. Enquanto a cepa CI Brener retoma seu crescimento após cerca de 10 dias, as cepas de linhagens ancestrais Silvio e Esmeraldo apresentam uma demora maior para a retomada do crescimento, de cerca de 15 dias.

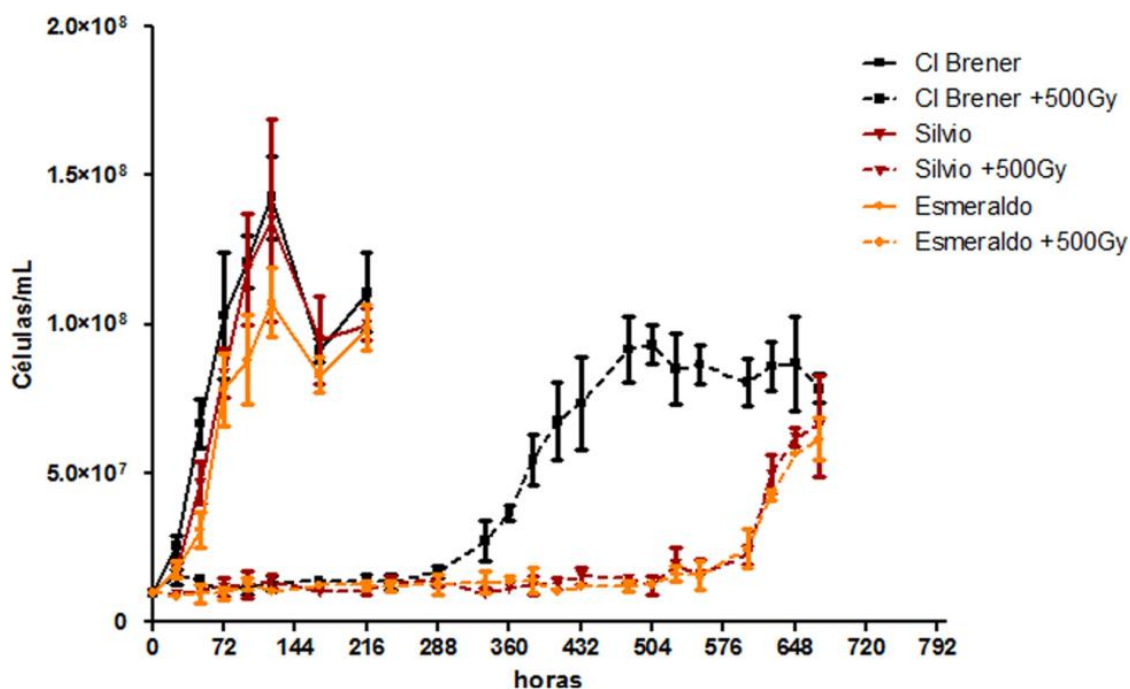


Figura 6 - Curva de crescimento de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* submetidos à radiação ionizante – Curva de crescimento de cepas Silvio (vermelho), Esmeraldo (laranja) e CI Brener (preto) expostas à 500Gy de radiação ionizante (linhas tracejadas) e não irradiadas (linhas cheias). O gráfico mostra que, apesar de variável, todas as cepas apresentam em comum uma demora para a retomada do crescimento em meio líquido.

4.2. O atraso na retomada de crescimento é comum a outras cepas de linhagens não híbridas de *Trypanosoma cruzi*

Afim de investigar se a resposta observada poderia ser diferente entre cepas de uma mesma linhagem, foram escolhidas outras cepas representantes das DTU's T. cruzi I e T. cruzi II utilizadas no experimento anterior. Foram utilizadas as cepas Y (representante da DTU T. cruzi II) e a cepa Dm28c (representante da DTU T. cruzi I). Como podemos observar nos gráficos da figura 7, ambas as cepas apresentam o mesmo fenótipo das outras representantes de suas respectivas DTU's. Assim como as cepas Silvio e Esmeraldo, as cepas Y e Dm28c também apresentaram um tempo de recuperação do crescimento bem maior do que o da cepa CI Brener, demonstrando que esse atraso nesta retomada de crescimento pode estar relacionado não com alguma particularidade da cepa, mas podendo ser uma característica de linhagens ancestrais quando comparadas com linhagens híbridas.

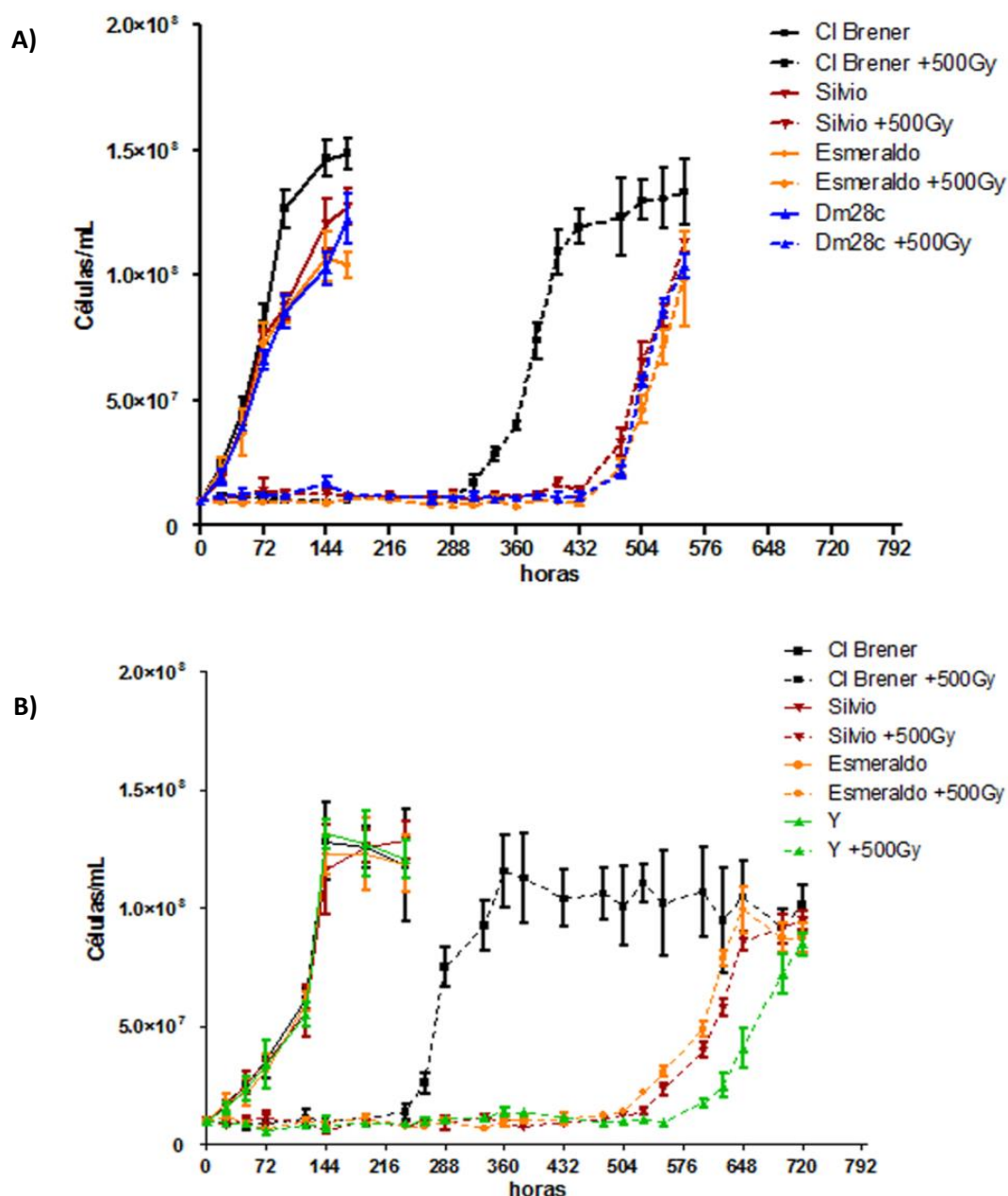


Figura 7 - Curva de crescimento de outras cepas representantes de linhagens de *Trypanosoma cruzi* – Curva de crescimento utilizando outras cepas representantes das mesmas linhagens ancestrais não-híbridas em comparação com a linhagem híbrida. As linhas tracejadas representam células irradiadas e as linhas cheias os controles não irradiados. A) Curva utilizando as cepas CI Brener (preto), Sílvia (vermelho), Esmeraldo (laranja) e Dm28c (azul). A cepa Dm28c é outra representante da DTU *T. cruzi* I e possui fenótipo semelhante às cepas Sílvia e Esmeraldo. B) Curva utilizando as cepas CI Brener (preto), Sílvia (vermelho), Esmeraldo (laranja) e Y (verde). Assim como as cepas não-híbridas Sílvia e Esmeraldo, a cepa Y também possui o fenótipo de atraso na retomada do crescimento após a irradiação.

Na classificação atual das linhagens de *Trypanosoma cruzi*, apesar de algumas incertezas como quanto à relação de cepas da DTU *T. cruzi* IV, tem-se que as linhagens *T.*

cruzi V e T. cruzi VI são híbridas. Dessa forma, as linhagens I, II e III seriam consideradas linhagens ancestrais à estas duas DTU's. Em um trabalho recente foram encontradas evidências que reforçam que um evento de hibridização entre as linhagens T. cruzi II e T. cruzi III poderia ter dado origem às cepas de linhagens híbridas (Baptista et al. 2014). Dessa forma, considerando o caráter ancestral da DTU T. cruzi III, avaliamos a resposta à radiação ionizante de uma cepa representante desta DTU (Cepa 231). Como mostrado na figura 8, a cepa 231 também possui um fenótipo de atraso na retomada do crescimento. Este fenótipo é semelhante ao das cepas de outras DTU's não-híbridas, podendo ser mais um indício de seu caráter ancestral.

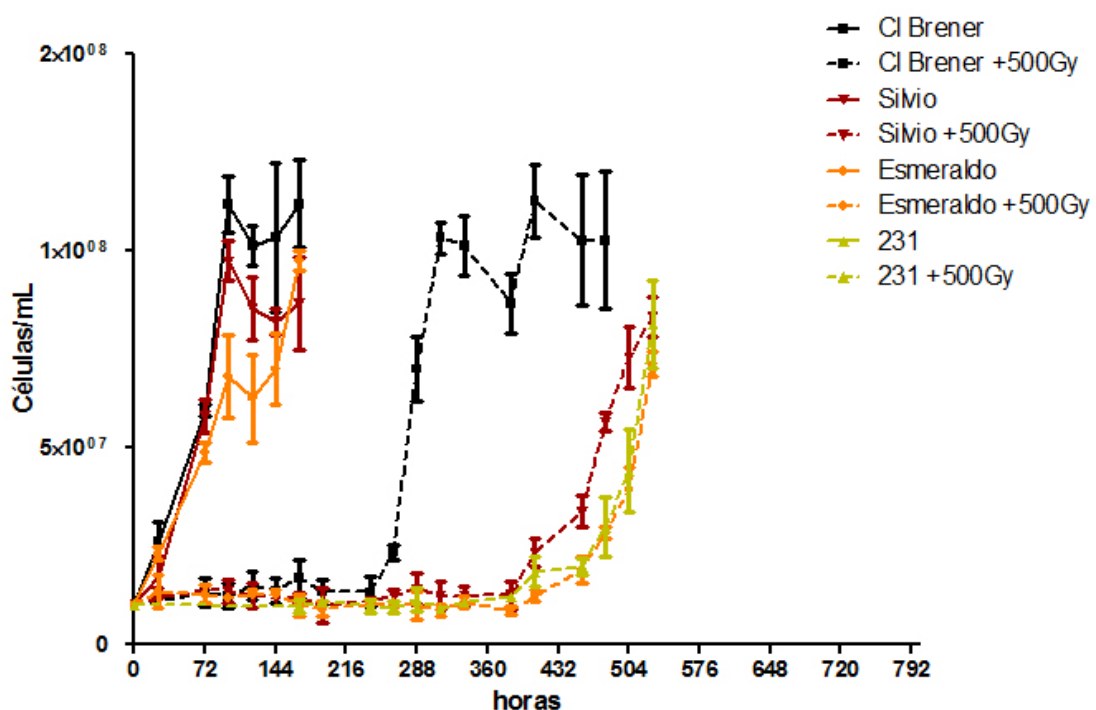


Figura 8 - Curva de crescimento de outra linhagem ancestral após exposição à radiação ionizante – A curva apresenta o fenótipo da cepa 231 (amarelo) representante de outra DTU ancestral, T. cruzi III. Quando comparada com a cepa CI Brener (preto), a cepa 231 apresentou também um atraso na retomada do crescimento, como as cepas Sílvio (vermelho) e Esmeraldo (laranja).

Em todas as curvas analisadas, a cepa híbrida foi capaz de reestabelecer seu crescimento antes das cepas de linhagens ancestrais analisadas. Estes resultados sugerem que a resposta as quebras de fita dupla podem variar de acordo com a composição genética da cepa em questão. Para todas as curvas o padrão de resposta foi o mesmo, com a cepa híbrida sendo capaz de retomar seu estado de crescimento mais rapidamente que outras cepas.

4.3. Análise da sequência das principais proteínas envolvidas no reparo por recombinação homóloga em tripanossomatídeos

Para verificar se a diferença na resposta à radiação ionizante poderia estar relacionada a polimorfismos presentes nas proteínas envolvidas na recombinação homóloga (única via completamente identificada em Tripanossomatídeos que repara quebras dupla), foram realizadas análises *in silico* em busca de possíveis diferenças.

As proteínas analisadas foram: Mre11, Rad50, NBS 1 - formadoras do complexo MRN - , RPA, BRCA2 e Rad51. O resumo da análise destas proteínas, bem como sua principal função envolvida no reparo, está descrito na tabela 2. A análise e comparação destas proteínas entre as cepas Silvio, Cl Brener e Esmeraldo (cepas que tinham seu genoma publicado na época que o trabalho se iniciou) revelou algumas características com relação à sequência e estrutura tridimensional.

O complexo MRN é formado pelas proteínas Mre11, Rad50 e NBS1. Este complexo é responsável pelo processo de ressecção do local de quebra, gerando filamentos de fita simples que irão se ligar à proteína RPA e posteriormente participar do processo de invasão mediado por Rad51 (Heyer 2007). Todas as três proteínas foram encontradas no genoma dos três parasitos.

Para a proteína Mre11 não foi encontrada diferença no tamanho da proteína, com todas apresentando 749 aminoácidos e o mesmo domínio funcional de ligação ao DNA. A análise pelo servidor Pfam demonstrou que os domínios funcionais de ligação ao DNA e de fosfoesterase são conservados e estão na mesma posição da proteína. A presença destes dois domínios condiz com as funções já descritas para a proteína Mre11, relacionadas à ativação de ATM para sinalização de reparo e de ligação ao DNA para ação de nuclease do complexo. O alinhamento da proteína na figura 9 mostra a existência de 12 polimorfismos, porém apenas 3 destes polimorfismos causam mudança para aminoácidos de características físico-químicas distintas. Nenhum destes polimorfismos, porém, foi capaz de alterar a estrutura da proteína de forma significativa.

Tabela 2 - Análise das principais proteínas envolvidas no HRR destacadas com sua função no processo, tamanho da proteína e domínios funcionais identificados pelo software Pfam

Proteína	Função	Cepa	Tamanho da Proteína	Domínios envolvidos no HRR identificados pelo Pfam
Mre11	Formação do complexo MRN para o processamento da quebra de fita dupla, e possui atividade endonuclease e exonuclease	CI Brener	749 aminoácidos	Mre11 DNA binding domain
		Esmeraldo	749 aminoácidos	Mre11 DNA binding domain
		Silvio	749 aminoácidos	Mre11 DNA binding domain
NBS1	Parte do complexo MRN e sinalização de checkpoint da fase S do ciclo celular	CI Brener	989 aminoácidos	FHA Domain
		Esmeraldo	981 aminoácidos	FHA Domain
		Silvio	990 aminoácidos	FHA Domain
Rad 50	Formação do complexo MRN para o processamento da quebra de fita dupla,.	CI Brener	1346 aminoácidos	Exonuclease SbcCD, C subunit
		Esmeraldo	1346 aminoácidos	Exonuclease SbcCD, C subunit
		Silvio	1346 aminoácidos	Exonuclease SbcCD, C subunit
RPA	Ligação ao DNA de fita simples durante o início do processo de reparo	CI Brener	264 aminoácidos	Replication protein A C terminal
		Esmeraldo	264 aminoácidos	Replication protein A C terminal
		Silvio	264 aminoácidos	Replication protein A C terminal
Rad51	Forma um filamento nucleoproteico com o DNA fita simples no local de quebra e promove a invasão e procura de homologia pelo processo de HRR	CI Brener	371 aminoácidos	Helix-hairpin-helix domain and Rad51 domain
		Esmeraldo	371 aminoácidos	Helix-hairpin-helix domain and Rad51 domain
		Silvio	371 aminoácidos	Helix-hairpin-helix domain and Rad51 domain
BRCA2	Carregamento de Rad51 no local da quebra de dupla fita, em substituição à RPA, permitindo a formação do filamento nucleoproteico	CI Brener	1030 aminoácidos	2 BRC Domains
		Esmeraldo	1050 aminoácidos	2 BRC Domains
		Silvio	986 aminoácidos	1 BRC Domain

Cl Brener (T. cruzi VI)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
Metallophos	Calcineurin-like phosphoesterase	Domain	CL0163	14	254	14	253
Mr11 DNA bind	Mr11 DNA-binding presumed domain	Domain	n/a	297	470	297	470

Esmeraldo (T. cruzi II)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
Metallophos	Calcineurin-like phosphoesterase	Domain	CL0163	14	254	14	253
Mre11 DNA bind	Mre11 DNA-binding presumed domain	Domain	n/a	297	470	297	470

Silvio (T. cruzi I)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
Metallophos	Calcineurin-like phosphoesterase	Domain	CL0163	14	254	14	253
Mre11_DNA_bind	Mre11 DNA-binding presumed domain	Domain	n/a	297	470	297	470

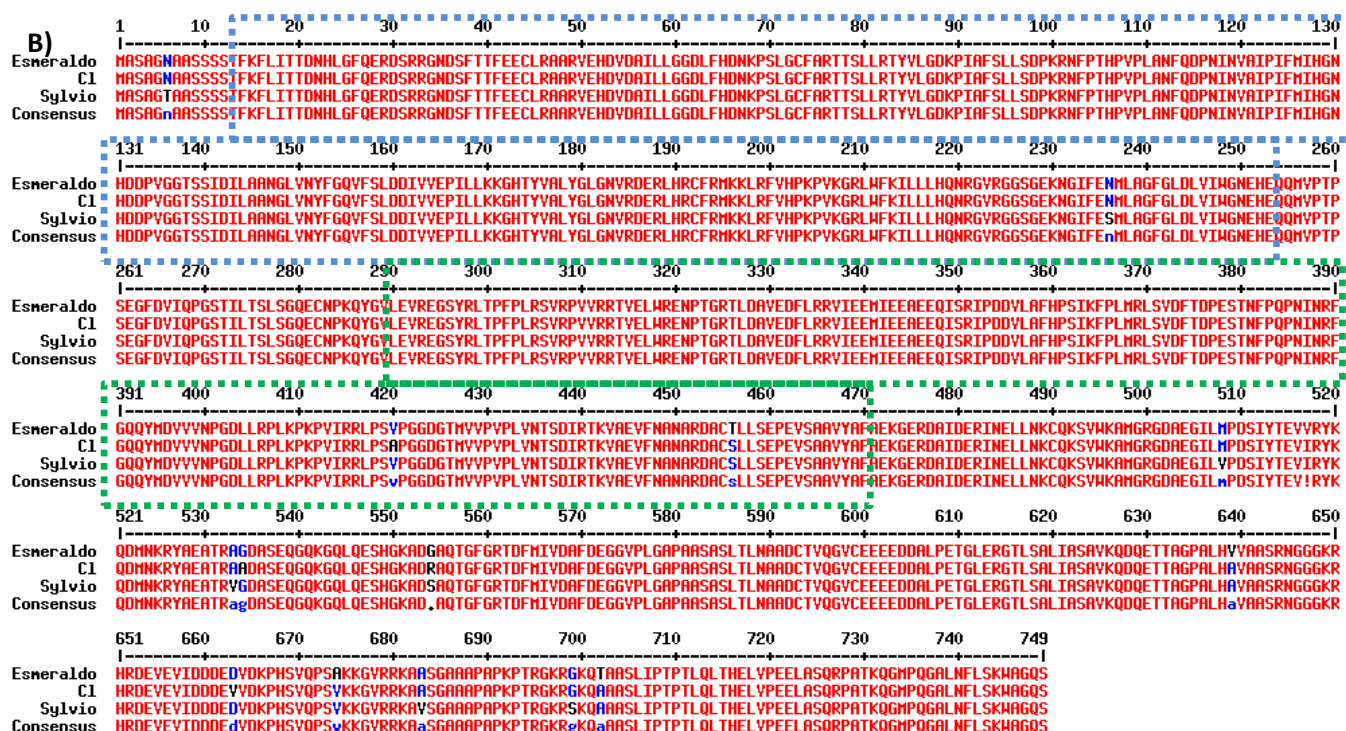


Figura 9 - Análise da proteína Mre11 – A) A análise pelo servidor Pfam demonstrou que a proteína Mre11 é altamente conservada para as três cepas, contendo os mesmos domínios nas mesmas posições. **B)** Comparação da sequência de aminoácidos da proteína Mre11 das cepas Silvio, CI Brener e Esmeraldo. Os aminoácidos em vermelho são idênticos para as três cepas. Os aminoácidos em azul são compartilhados por duas das três cepas e os aminoácidos pretos são específicos de uma cepa. O box azul destaca o domínio Metallophos (envolvido em processos de sinalização pelo complexo MRN) e o box verde o domínio de ligação ao DNA da proteína Mre11.

Para a proteína Rad50 o mesmo perfil foi encontrado. A sequência é altamente conservada (como demonstrado pelo alinhamento na Figura 10), porém apresenta um número maior de polimorfismos: 39 no total, sendo que destes, 14 são de aminoácidos com características físico-químicas distintas. Os domínios funcionais preditos pelo Pfam também são os mesmos para as três cepas e estão presentes na mesma porção das respectivas proteínas. Os dois domínios encontrados também se relacionam com a função de sinalização para o reparo (domínio da família AAA – ATPases Associated with cellular

Activities). O outro domínio encontrado na proteína Rad50 diz respeito à unidade exonucleásica SbcCD, sendo o principal responsável pela atividade de remoção de nucleotídeos do complexo MRN.

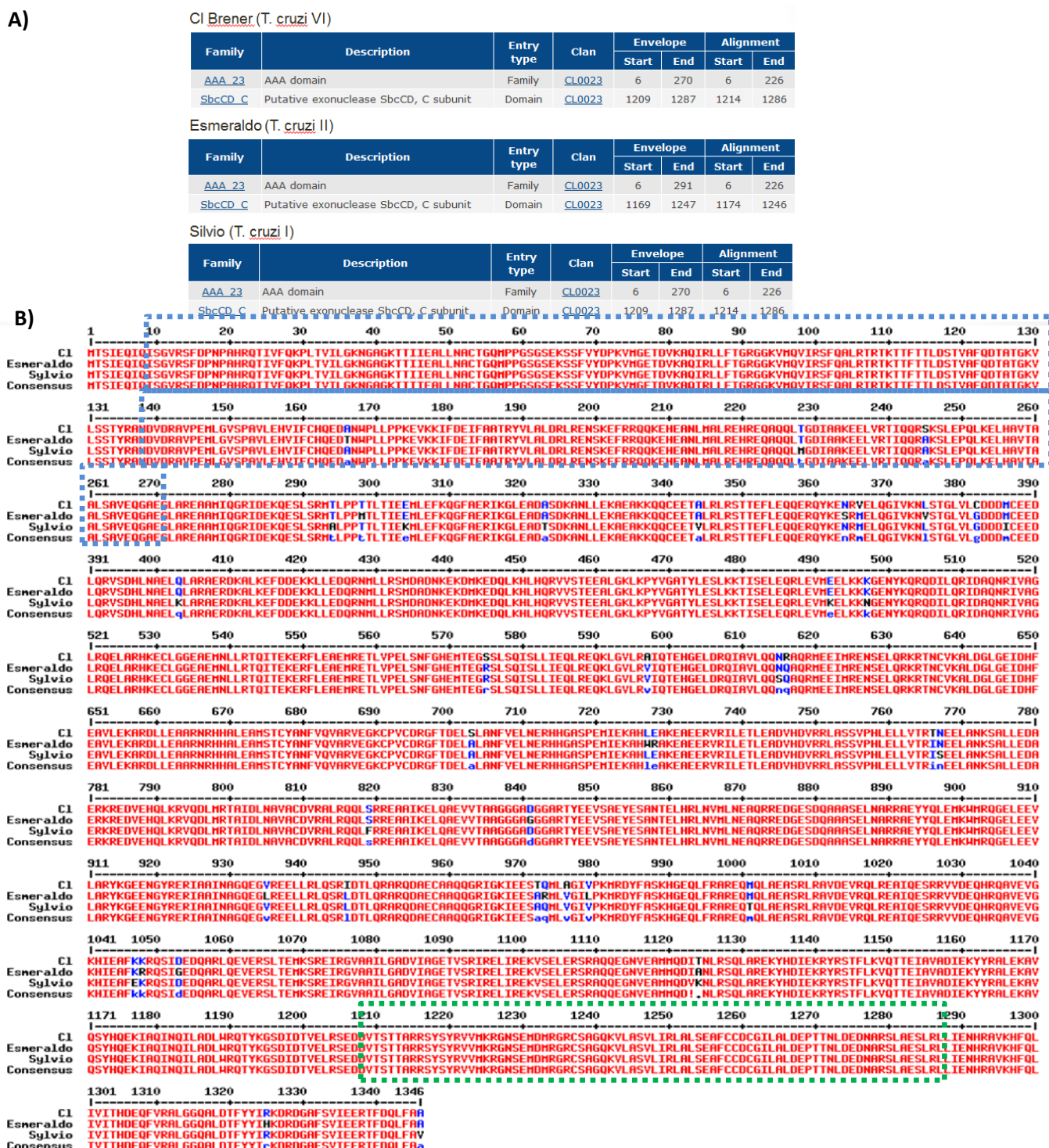


Figura 10 - Análise da proteína Rad50 - A) A análise pelo Pfam demonstrou que os domínios funcionais da proteína são os esperados e se encontram na mesma posição para as três cepas. **B)** O alinhamento desta proteína mostra um maior número de polimorfismos entre as três proteínas do complexo MRN, porém nenhum destes aminoácidos é capaz de alterar significativamente a estrutura destas proteínas. O box azul destaca o domínio AAA e em verde o domínio exonuclease SbcCD.

A mesma análise, repetida para a proteína NBS1 revelou algumas particularidades com relação à proteína de Silvio. Além dos polimorfismos que as proteínas apresentam, a proteína NBS1 da cepa Silvio possui uma repetição de prolinas. Porém, a análise dos domínios funcionais da proteína demonstrou que todas as proteínas apresentam os mesmos domínios nas mesmas regiões (Figura 11). Para o complexo MRN, portanto, as três proteínas apresentam pequenas diferenças, mas estas diferenças não alteram significativamente a estrutura de cada uma delas. Grande parte dos polimorfismos encontrados não alteram a característica físico-química do aminoácido presente e não são capazes de alterar a posição ou estrutura do domínio. O domínio FHA (ForkHead Associated domain) encontrado na proteína NBS1 das três cepas se relaciona com a transdução de sinal para o reparo. A capacidade do complexo MRN de sinalizar a partir da via de ATM é dependente da função da proteína NBS1. A atuação deste domínio é o primeiro passo para o recrutamento das outras proteínas (rad50 e Mre11) para a formação do complexo MRN.

As três proteínas do complexo MRN estão presentes nas três cepas e com seus domínios funcionais esperados. Nenhum dos polimorfismos encontrados foi capaz de alterar estes domínios.

Logo após a ressecção causada pelo complexo MRN ocorre a formação de filamentos de fita simples de DNA. Para evitar que estes filamentos formem estruturas secundárias, a proteína RPA se liga à eles, além de participar da ativação de ATR na cascata de sinalização do reparo de quebras de fita dupla (Saha et al. 2013). Esta proteína é essencial em vários organismos e foi encontrada em todos os três parasitos (Figura 12). Para os três parasitos, a proteína RPA é altamente conservada, não apresentando nenhum polimorfismo em sua sequência. Os domínios encontrados para a proteína são os esperados. Ambos domínios encontrados (RPA_C e OB-fold nucleic acid binding domain) são responsáveis pela ligação de RPA à molécula de ssDNA e suas funções de sinalização

A)

CI Brener (*T. cruzi* VI)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
FHA	FHA domain	Family	CL0357	24	102	24	102

Esmeraldo (*T. cruzi* II)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
FHA	FHA domain	Family	CL0357	24	102	24	102

Sylvio (*T. cruzi* I)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
FHA	FHA domain	Family	CL0357	24	102	24	102

B)

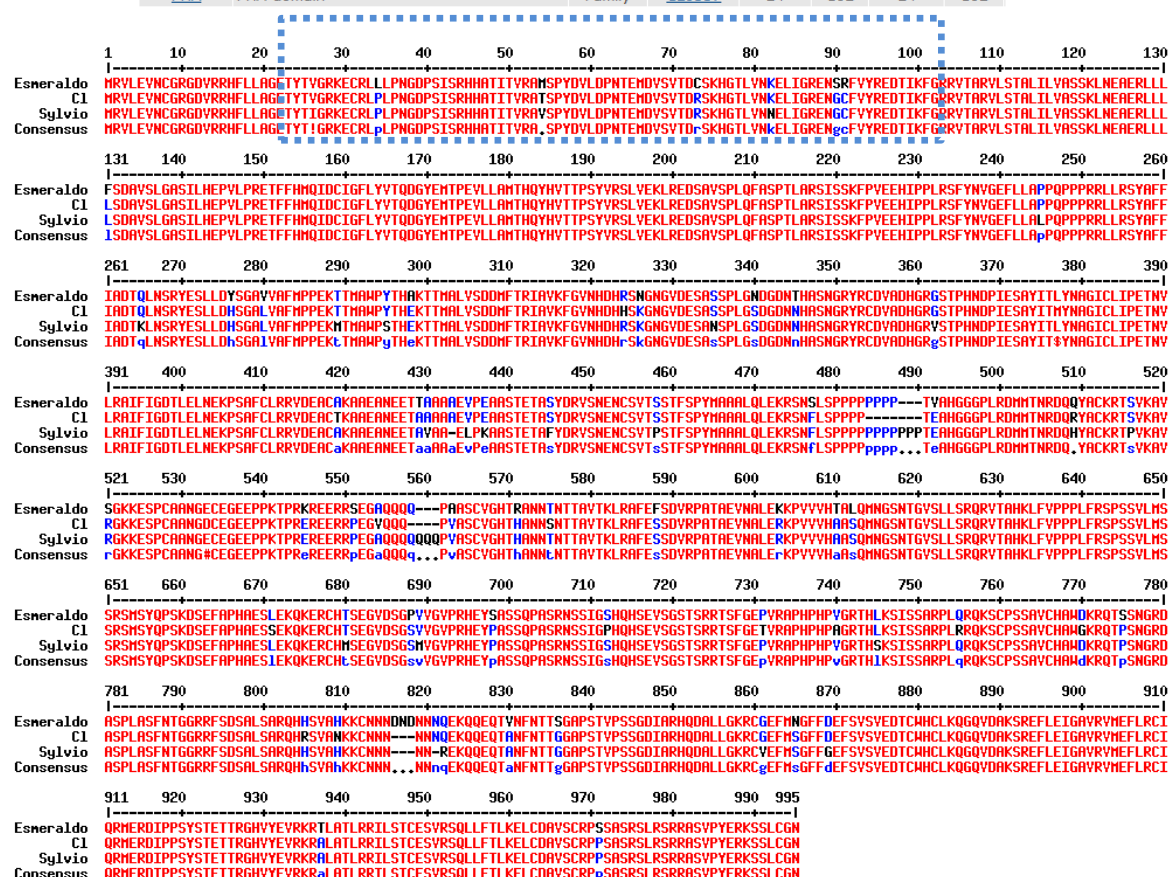


Figura 11 - Análise da sequência da proteína NBS1 – A) A análise pelo servidor Pfam mostrou que os domínios de todas as proteínas são os mesmos e esperados para a proteína NSB1. Apesar de algumas diferenças, nenhum dos domínios foi alterado entre as três cepas. **B)** Comparação da sequência de aminoácidos da proteína NBS1 nas cepas Esmeraldo, Sílvia e CI Brener. Os aminoácidos em vermelho são idênticos para as três cepas, os azuis são compartilhados por duas das três cepas e os pretos são polimorfismos de cada cepa. O box azul mostra a localização do domínio FHA

A)

CI Brener (T. cruzi VI)							
Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
tRNA_anti-codon	OB-fold nucleic acid binding domain	Domain	CL0021	66	160	67	139
RPA_C	Replication protein A C terminal	Domain	CL0123	163	261	163	260

Esmeraldo (T. cruzi II)							
Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
tRNA_anti-codon	OB-fold nucleic acid binding domain	Domain	CL0021	66	160	67	139
RPA_C	Replication protein A C terminal	Domain	CL0123	163	261	163	260

Silvio (T. cruzi I)							
Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
tRNA_anti-codon	OB-fold nucleic acid binding domain	Domain	CL0021	66	160	67	139
RPA_C	Replication protein A C terminal	Domain	CL0123	163	261	163	260

B)

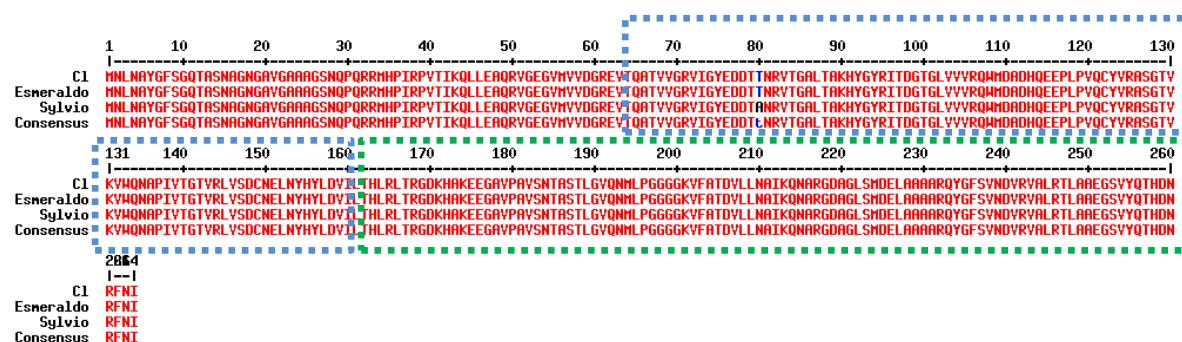


Figura 12 - Análise da proteína RPA – A) Domínios encontrados pela análise feita no software Pfam. Os domínios encontrados para a proteína RPA estão relacionados com a função de ligação à filamentos de fita simples de DNA gerados durante vários processos de metabolismo do DNA. **B)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína RPA das cepas Silvio, CI Brener e Esmeraldo. Os aminoácidos em vermelho são idênticos para as três cepas e aminoácidos em azul e preto representam polimorfismos. A proteína RPA é conservada entre as três cepas. O box em azul representa o domínio de ligação ao DNA (tRNA anti-codon) e o box verde representa o domínio RPA C.

Assim como RPA, a proteína Ra51 também é conservada (Figura 13). Para as três cepas a sequência da proteína é a mesma, sem apresentar nenhum polimorfismo. A proteína Rad51 de *Trypanosoma cruzi* apresenta dois domínios funcionais. O primeiro domínio encontrado (Helix-hairpin-helix domain) é responsável pela ligação de Rad51 ao DNA. O segundo domínio é denominado Rad51, sendo o domínio responsável pela catálise da invasão de uma fita em outra durante o processo de recombinação.

A análise da sequência da proteína BRCA2 revelou que existem diferenças importantes entre as três cepas estudadas (Figura 14). Para a cepa Silvio, o tamanho da proteína é bem distinto quando comparado com as cepas CI Brener e Esmeraldo. A proteína BRCA2 de Silvio possui 986 aminoácidos, ao passo que as proteínas de CI Brener e Esmeraldo possuem 1030 e 1050 aminoácidos, respectivamente.

A)

CI Brener (T. cruzi VI)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
HHH_5	Helix-hairpin-helix domain	Domain	CL0198	56	111	63	110
Rad51	Rad51	Domain	CL0023	114	370	114	369

Esmeraldo (T. cruzi II)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
HHH_5	Helix-hairpin-helix domain	Domain	CL0198	56	111	63	110
Rad51	Rad51	Domain	CL0023	114	370	114	369

Silvio (T. cruzi I)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
HHH_5	Helix-hairpin-helix domain	Domain	CL0198	56	111	63	110
Rad51	Rad51	Domain	CL0023	114	370	114	369

B)

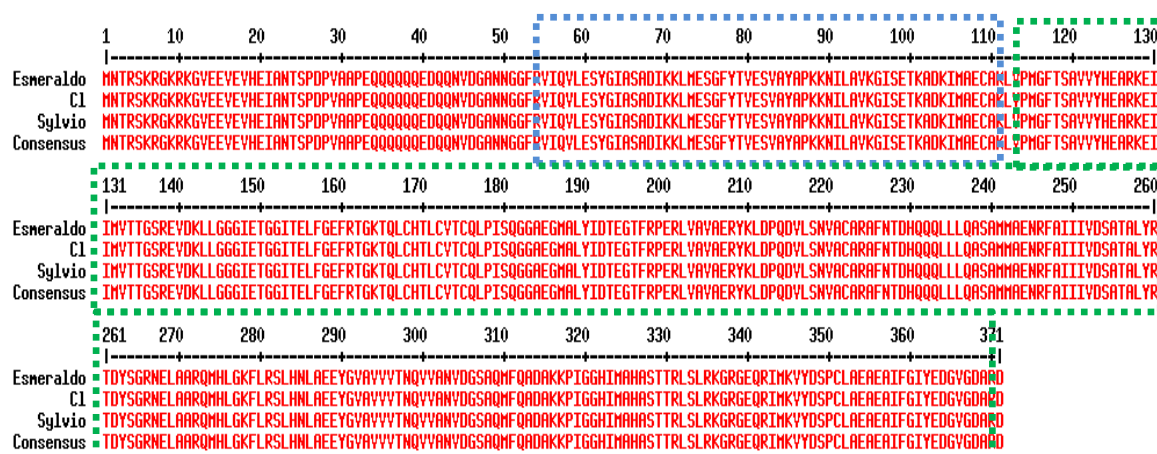


Figura 13 - Análise da sequência da proteína Rad51 – A) A busca pelos domínios funcionais da proteína Rad51 encontrou os dois domínios esperados para a proteína. **B)** Alinhamento da sequência da proteína Rad51 para as três cepas analisadas. Os aminoácidos em vermelhos são comuns às três cepas. Não foram encontrados polimorfismos na sequência das proteínas das três cepas de *Trypanosoma cruzi*.

A análise em busca de domínios funcionais encontrou o domínio característico da proteína (domínio BRC, de ligação à Rad51) na sequência das três cepas. Porém, a cepa Silvio possui um domínio BRC a menos que as cepas Esmeraldo e CI Brener. Quando foram alinhadas a sequência destas três proteínas foi visto que a proteína da cepa Silvio tem uma deleção em uma das regiões onde se esperaria que fosse encontrado o outro domínio BRC. Uma inserção, em uma região adjacente segundo domínio, também foi encontrada na proteína de Esmeraldo quando comparada com as outras cepas analisadas. A perda desta porção que poderia conter o segundo domínio BRC da proteína em Silvio pode estar relacionado com diferenças estruturais na proteína BRCA2, resultando em uma resposta diferente à radiação ionizante.

Cl Brener (T. cruzi VI)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
BRCA2	BRCA2 repeat	Family	n/a	64	90	65	87
BRCA2	BRCA2 repeat	Family	n/a	108	132	109	131

Esmeraldo (T. cruzi II)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
BRCA2	BRCA2 repeat	Family	n/a	64	90	65	87
BRCA2	BRCA2 repeat	Family	n/a	108	132	109	131

Silvio (T. cruzi I)

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment	
				Start	End	Start	End
BRCA2	BRCA2 repeat	Family	n/a	64	88	65	87

B)

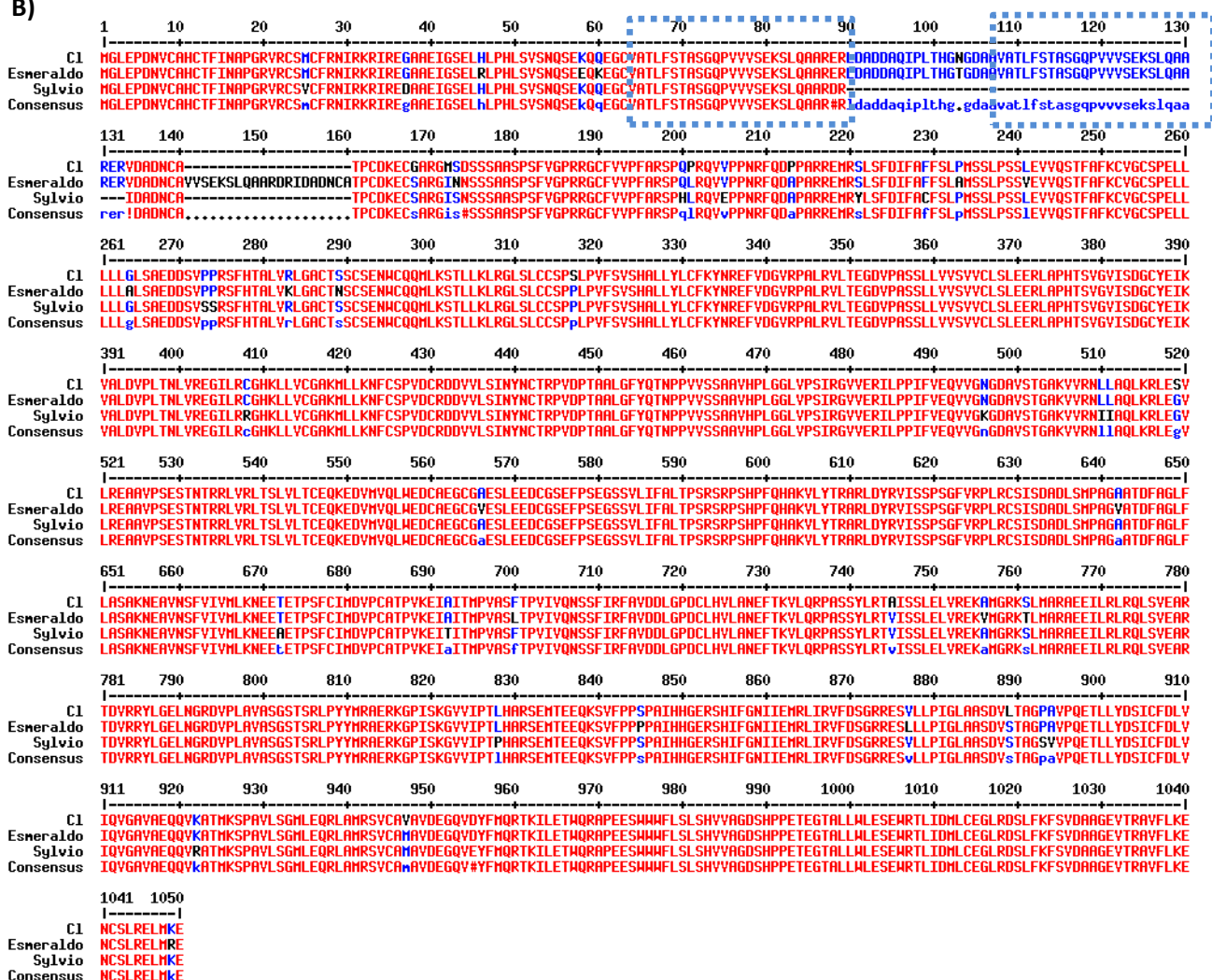


Figura 14 - Análise da proteína BRCA2 – A) A procura pelos domínios funcionais na proteína BRCA2 revelou a presença do domínio BRC característico. Chama a atenção a posição semelhante do primeiro domínio para todas as cepas (entre os aminoácidos 64 e 90) e a ausência do segundo domínio para a cepa Silvio. **B)** Alinhamento da proteína BRCA2 para as três cepas estudadas. Aminoácidos em vermelho são comuns as três cepas, e aminoácidos pretos e azuis representam polimorfismos entre elas. Os traços representa deleção em uma sequência em comparação com as outras. Destacado pelo box estão os domínios BRC encontrados pelo software Pfam. O alinhamento mostra a ausência da região correspondente ao segundo domínio da cepa Silvio quando comparado com as cepas Cl Brener e Esmeraldo.

4.4. A proteína BRCA2 das cepas em estudo apresentam diferenças com relação à estrutura

A perda de um domínio BRC para a proteína BRCA2 em Silvio poderia estar relacionada com o atraso na resposta à irradiação. Porém, a cepa Esmeraldo possui dois domínios assim como a cepa CI Brener, mas possui uma resposta de retomada de crescimento atrasada, assim como a cepa Silvio. Para tentar entender melhor como as diferenças encontradas na sequência poderiam estar relacionadas com diferenças na funcionalidade, realizamos uma análise mais aprofundada da proteína BRCA2 de cada uma das cepas em estudo e de seus domínios funcionais.

O domínio BRC contém cerca de 39 aminoácidos que são essenciais para a ligação à Rad51. Apesar do motivo de ligação em Rad51 não ser completamente elucidado, sabe-se que é o motivo BRC que é responsável pela desestabilização do oligômero de Rad51, ligação da mesma à BRCA2 e depois deslocamento de RPA para ligação de Rad51 para formação do filamento nucleoproteico durante o processo de reparo (Lord & Ashworth 2007). A presença de diferentes BRC's, em alguns organismos, resulta em diferentes funções para eles. Alguns motivos BRC em determinados organismos protegem a proteína Rad51 da degradação pelo proteassomo (Magwood et al. 2013). Dois motivos surgem como importantes nos domínios BRC, o primeiro o motivo FxxA e o segundo o motivo LFDE (Pellegrini et al. 2002).

Ao analisarmos os domínios BRC das três cepas, podemos perceber que apenas o motivo FxxA existe nos parasitos (em todos os casos formado pela sequência FSTA (Figura 15). A região correspondente ao primeiro motivo BRC é conservada entre todas as três cepas, contendo apenas dois polimorfismos quando comparamos a cepa Esmeraldo com as outras duas cepas. Quando analisamos o segundo motivo BRC percebemos que, entre as cepas Esmeraldo e CI Brener, que foram preditas como apresentando o segundo motivo BRC, a região é conservada. Porém, ao analisarmos a região correspondente na proteína de Silvio, percebemos que esta região foi perdida e nenhuma conservação aparente na sequência é possível de ser vista.

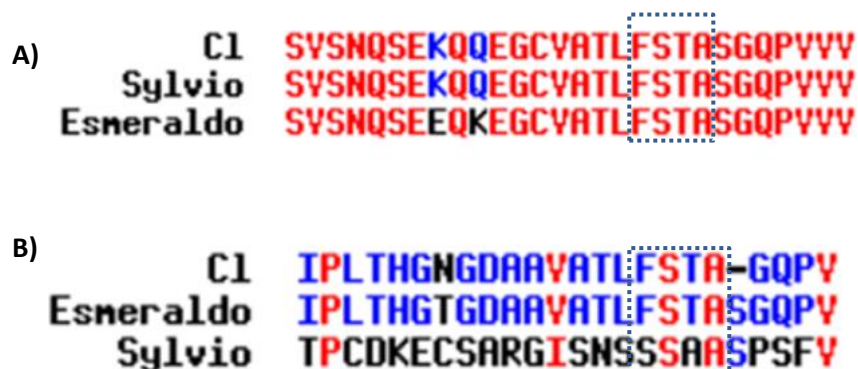


Figura 15 - Alinhamento da região dos motivos BRC em *Trypanosoma cruzi* – A) Alinhamento da região do primeiro motivo BRC – Para o primeiro motivo BRC encontramos uma alta conservação entre os domínios e o motivo FxxA, presente como FSTA. **B)** Alinhamento da região do segundo motivo BRC das cepas Esmeraldo e Cl Brener em comparação com a região correspondente em Sylvio. O segundo motivo BRC é conservado entre as cepas Cl Brener e Esmeraldo, porém ele está ausente na cepa Sylvio, com a região correspondente não possuindo nenhuma conservação aparente com as outras cepas. O box destaca o motivo FSTA presente nos domínios BRC encontrados.

Foi feito então a modelagem por homologia da proteína BRCA2 das três cepas para verificar se alguma destas diferenças poderia resultar em mudanças na conformação tridimensional das proteínas. Após a busca por similaridade na ferramenta BLASTp, foi utilizado como molde para o processo de modelagem o cristal da proteína BRCA2 de humanos cristalografada disponível no banco de dados PDB (PDB Code: 1MIU). As estruturas das três proteínas foram então analisadas pelo programa PROCHECK e foram consideradas válidas aquelas que possuíam valores de regiões favorecidas de mais de 80% e uma soma de valores de regiões permitidas e favorecidas de mais de 90%. A figura 16 mostra os valores obtidos para as melhores estruturas encontradas e que foram utilizadas no restante do trabalho.

As três estruturas apresentam similaridades, porém a localização dos domínios BRC nas estruturas preditas é diferente para cada uma delas. Na figura 17 estão destacados os motivos BRC de cada uma das proteínas BRCA2 para cada cepa em questão. A sobreposição das imagens destaca o posicionamento distinto de cada um destes motivos BRC. A validação da sobreposição foi feita a partir dos valores de RMSD e TM-align. Para todos os casos os valores ficaram dentro dos limites considerados aceitáveis (TM-score entre 0,5 e 1).

Para o primeiro motivo BRC (Figura 17 A), temos um valor de RMSD de 4,92 e um valor de TM-score de 0,66441, validando a sobreposição para as diferenças observadas. Na análise do segundo motivo BRC, obtivemos um valor de TM-score de 0,55129 e um valor de RMSD de 4,35 (Figura 17B). Como está destacado na figura, a posição do primeiro motivos

BRC cepas Esmeraldo e CI Brener não é coincidente com o motivo único da cepa Sílvia. O alinhamento da sequência da proteína das três cepas mostra que o motivo BRC único da cepa Sílvia é coincidente com o primeiro motivo das cepas CI Brener e Esmeraldo entretanto, a sobreposição mostra que, na estrutura predita, este domínio único está em posição próxima ao segundo domínio BRC das cepas CI Brener e Esmeraldo.

A posição distinta, assim como a acessibilidade distinta destes domínios poderia então estar relacionada com a diferença na resposta observada, já que a interação entre Rad51 e BRCA2 é crucial para o processo. Para tentar elucidar esta questão fizemos a previsão da interação entre as proteínas de cada cepa

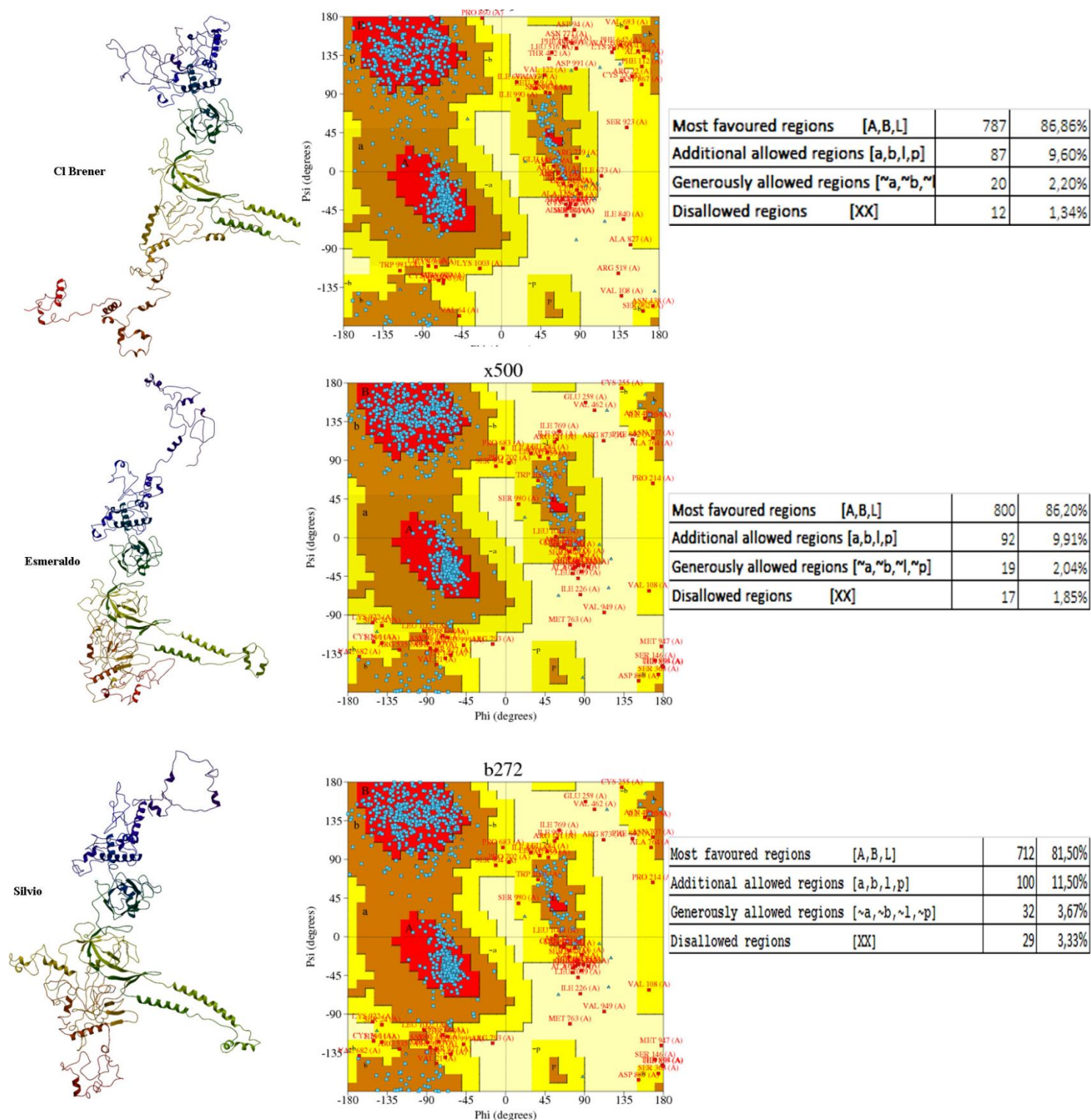


Figura 16 -Melhores estruturas geradas a partir da modelagem por homologia da proteína BRCA2 das três cepas – Os melhores modelos estão na figura acima. Os valores ao lado representam as proporções observadas no gráfico de Ramachandran. Os melhores modelos obtiveram todos regiões mais favorecidas e permitidas como mais de 90% da estrutura. Os aminoácidos pertencentes aos domínios BRC em cada uma das proteínas estão todos incluídos nas regiões mais favorecidas e permitidas.

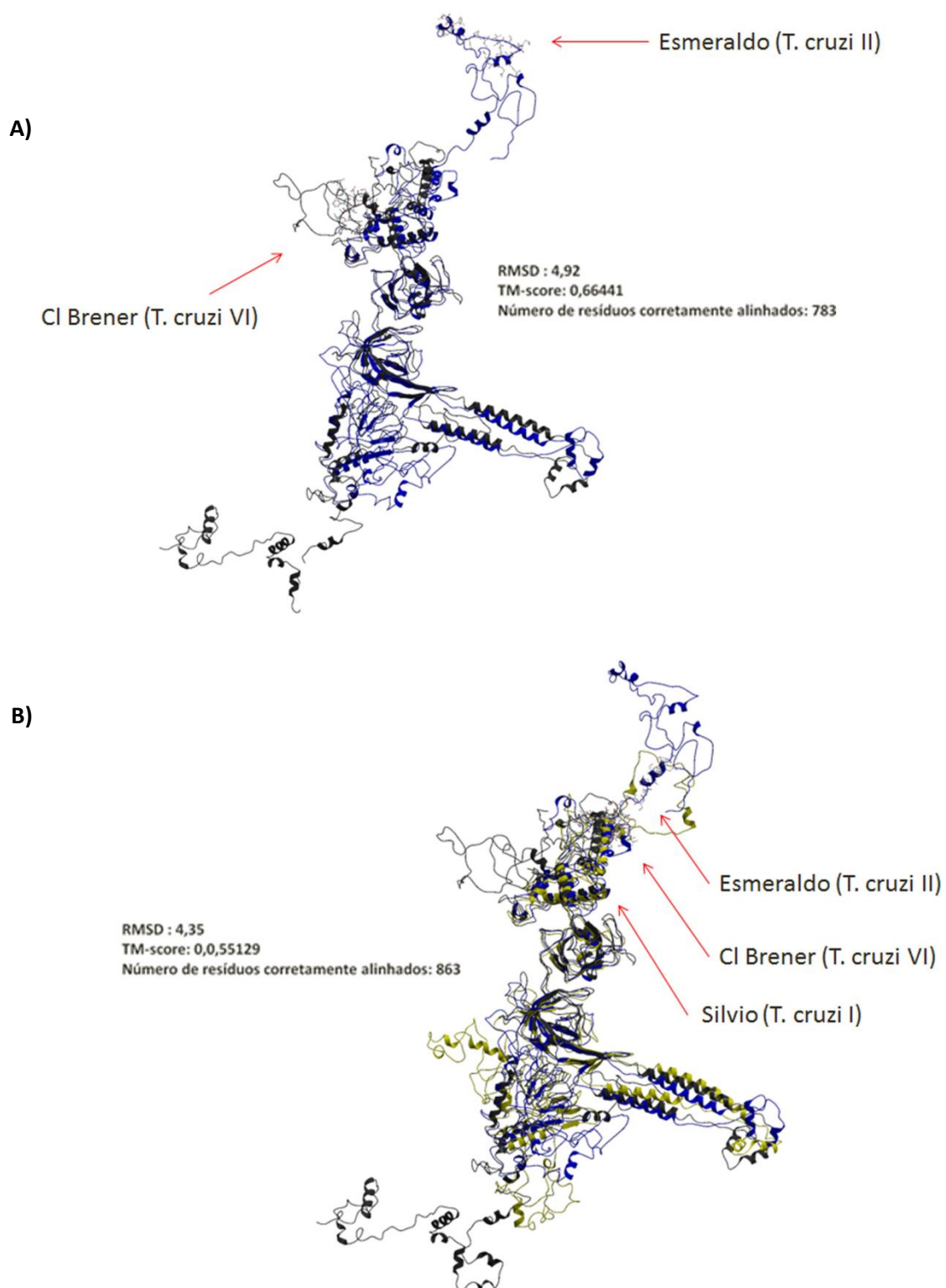


Figura 17 - Sobreposição da proteína BRCA2 – A imagem mostra a sobreposição destacando os motivos BRC (em modelo bola e bastão) em cada proteína. As estruturas tridimensionais da proteína BRCA2 de CI Brener (preto), cepa Silvio (amarelo) e Esmeraldo (azul) estão representadas. Os valores de RMSD e TM-score permitem dizer que as estruturas não são diferentes por aleatoriedade, e portanto a posição predita para cada um dos domínios é distinta. O motivo único da cepa Silvio se alinha com o primeiro motivo das cepas CI Brener e Esmeraldo, porém na análise da estrutura predita sua posição corresponde ao segundo domínio destas cepas.

4.5. A interação predita entre as proteínas Rad51 e BRCA para cada cepa apresenta diferenças

As diferenças encontradas na proteína BRCA2 poderiam estar relacionadas com a ligação de Rad51 e o carregamento desta no DNA para formação do filamento nucleoproteico durante o início do processo de reparo por recombinação. Desta forma, visando entender se a estrutura de cada cepa poderia influenciar na interação de Rad51 com BRCA2, foi feita uma análise de bioinformática da interação entre as duas proteínas.

O servidor HADDOCK nos permite comparar diferentes regiões de interação específica para o mesmo conjunto de proteínas. Os valores calculados pelo servidor HADDOCK para as interações estão mostrados na tabela 3. Quanto menor o valor do HADDOCK Score mais provável é aquela interação. Como mostrado na tabela, os valores para o segundo motivo BRC são menores, assim como seu RMSD para a proteína de CI Brener, permitindo inferir que a interação predita é mais estável para aquela região da proteína, permitindo inferir que a ligação de Rad51 poderia ser preferencial para este motivo. O mesmo padrão se repete para a proteína de Esmeraldo. Para a proteína de Silvio, a ligação no único motivo BRC é a com o menor score entre todas as cepas. Estes valores podem ser reflexos da acessibilidade dos dois domínios na estrutura da proteína, já que o programa permite que modificações estruturais da proteína sejam levadas em conta na análise da interação.

Tabela 3 - Valores da interação para a proteína BRCA2 nas diferentes regiões

	RMSD	Eletrostatic energy	Desolvation energy	Van der Waals Energy	Restraints violation energy	Buried Surface Area	Haddock Score
CI Brener (BRC1)	71.3 +/- 11.4	-365.7 +/- 94.1	46.8 +/- 7.7	-73.3 +/- 2.5	1709.1 +/- 247.45	2829.7 +/- 176.9	71.3 +/- 11.4
Esmeraldo (BRC1)	2.0 +/- 2.3	-440.8 +/- 37.4	41.9 +/- 7.6	-107.6 +/--13.5	1801.2+/- 134.85	3063.9 +/- 349.9	76.2 +/- 23.3
Silvio (BRC1)	7.5 +/- 0.3	-767.7 +/- 144.3	67.6+/- 17.5	-88.7 +/--7.4	1801.9+/- 113.89	3637.6 +/- 214.0	14.5 +/- 19.6
CI Brener (BRC2)	2.1 +/- 1.7	-441.9 +/- 47.4	42.2 +/- 19.0	-84.9 +/- 14.9	1904.8 +/- 141.94	2850.4 +/- 370.1	39.5 +/- 23.4
Esmeraldo (BRC2)	15.2 +/- 0.6	-653.0 +/- 95.4	82.4+/- 9.2	-88.3 +/- 12.5	1826.2 +/- 146.64	3660.8 +/- 136.9	22.3 +/- 19.5

Quando avaliados os gráficos dos scores dos melhores clusteres gerados pelo programa, com relação ao HADDOCK score, percebemos que existe um agrupamento e

valores menores (tanto de RMSD quando de HADDOCK score) para os segundos motivos de CI Brener e Esmeraldo (visto pelo agrupamento à direita dos principais clusteres para o primeiro motivo BRC de ambos). Em comparação, o mesmo ocorre para o motivo único de ligação da proteína da cepa Silvio (figura 18).

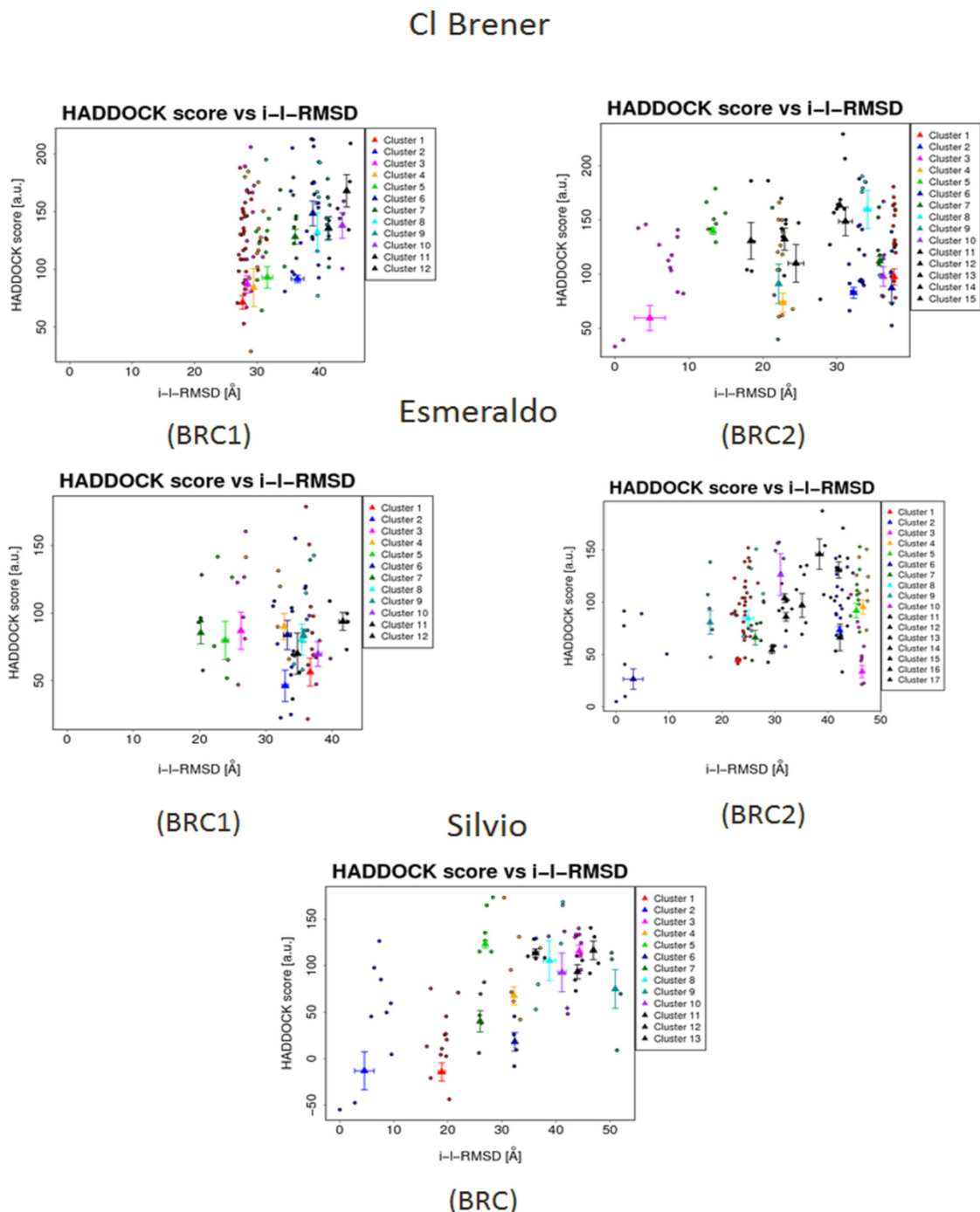


Figura 18 - Gráficos dos valores de HADDOCK score x RMSD para cada motivo BRC – O gráfico mostra que os valores dos clusteres gerados pelo programa tendem a se agrupar em regiões à direita (maiores valores de HADDOCK-score) e na porção superior do gráfico para o primeiro motivo BRC de CI Brener e Esmeraldo, indicando uma interação menos estável. O segundo motivo BRC destas cepas e o motivo único de Silvio possuem valores menores, indicando uma predição de interação mais estável. Os valores mostrados na tabela 3 são dos melhores clusteres gerados.

Os menores valores de HADDOCK sugerem que as ligações são mais estáveis para o segundo motivo BRC das cepas CI Brener e Esmeraldo. Apesar de único, o motivo BRC de Silvio também apresenta melhor solução do que os motivos BRC1 de Esmeraldo e CI Brener. Este fato pode estar relacionado com a proximidade entre o primeiro domínio das cepas CI Brener e Esmeraldo com o domínio único da cepa Silvio demonstrada na sobreposição das três proteínas. Podemos então inferir que os motivos BRC2 de CI Brener e Esmeraldo são preferenciais para a ligação de Rad51, com relação ao primeiro motivo de ambas. Além disso, apesar de não ser ideal para comparação entre complexos diferentes, os valores menores nos permitem inferir que a ligação mais forte seria feita no complexo da cepa Silvio, seguida pela de Esmeraldo e por fim a de CI Brener. Todos estes dados, porém, necessitam ser validados em experimentos de bancada.

4.6. Os níveis de transcrição dos genes BRCA2 e Rad51 são diferentes para as cepas estudadas

As proteínas BRCA2 e Rad51 são de fundamental importância para o processo de recombinação. Para inferir o nível de expressão destes genes, foi realizado a PCR em tempo real para as três cepas irradiadas nos tempos 0h, 24h e 48h após a irradiação e os valores foram comparados com a cepa CI Brener (utilizando o gene GAPDH como normalizador).

Visando investigar se haviam diferenças entre os níveis de transcritos destes genes antes da irradiação, foi realizada a PCR em tempo real das culturas nos mesmos tempos que as culturas irradiadas. A comparação dos níveis de Rad51 e BRCA2 sem a exposição à irradiação demonstrou que os níveis basais dos transcritos destas proteínas são menores para as cepas Silvio e Esmeraldo quando comparados com a cepa CI Brener (Figura 19). O nível menor ainda de BRCA2 detectado condiz com relatos da literatura de que os níveis desta proteína, com relação à Rad51 são de cerca de quatro vezes menores (Magwood et al. 2013).

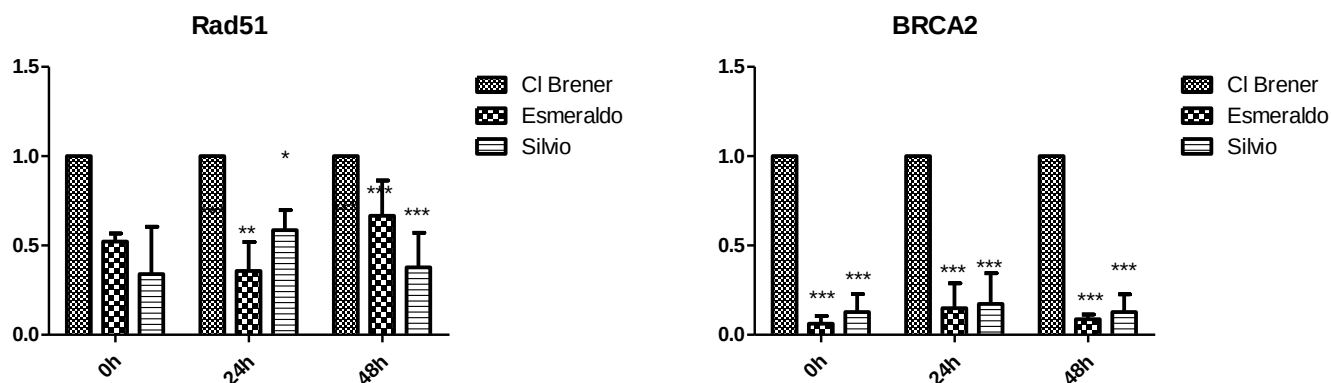


Figura 19 - Nível de transcrição dos genes Rad51 e BRCA2 antes da exposição à 500Gy de radiação ionizante – Os gráficos mostram que antes da exposição à radiação ionizante, os níveis dos transcritos de Rad51 e BRCA2 são significativamente menores para as cepas Esmeraldo e Silvio. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Após a irradiação, pode-se notar que os níveis de transcritos para BRCA2 e Rad51 foram maiores para cada uma das cepas (Figura 20). Para Rad51 era descrito que, após 24 horas da irradiação, ocorria um aumento de 2 vezes nos níveis de transcritos quando comparados com a cepa não irradiada (Regis-da-Silva et al. 2006). Um aumento similar foi encontrado para as três cepas neste experimento, mostrando que, após irradiado, todas são capazes de responder da mesma forma com relação à CI Brener. O aumento induzido pela radiação para todas as cepas foi o mesmo, e visto que os níveis basais para Silvio e Esmeraldo são menores antes da irradiação, os níveis após a irradiação continuaram menores para estas duas cepas.

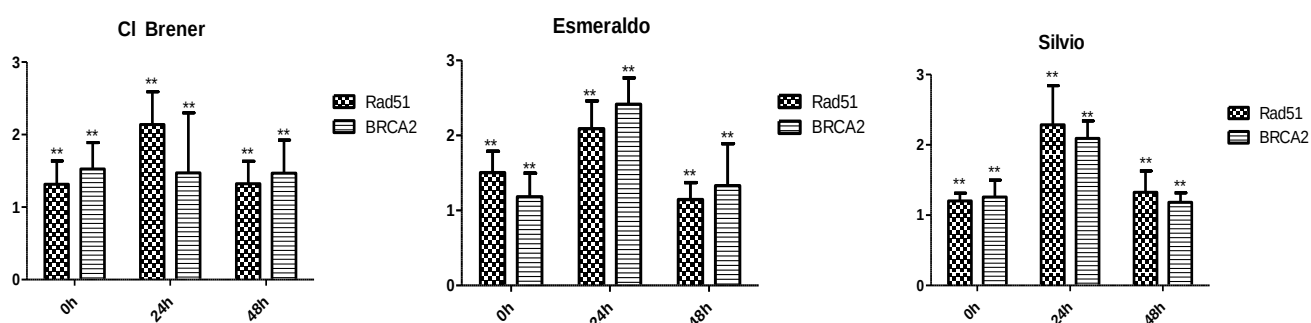


Figura 20 - Aumento no nível de transcrição dos genes Rad51 e BRCA2 para cada cepa – Os gráficos mostram o aumento nos níveis de transcrição para os genes Rad51 e BRCA2 para cada cepa, quando comparados com as cepas não irradiadas em cada tempo. Em todas foi observado um aumento no nível de transcrição, sendo que este aumento foi maior para o ponto 24 horas após a irradiação. O aumento não foi diferente quando foram comparados os valores entre as cepas. ** $p < 0,01$

Como mostrado na figura 21 abaixo, os aumentos não possuem diferença significativa entre as cepas. Todas passaram por um pico no aumento por volta de 24 horas de cerca de 2 vezes mais transcritos quando comparados com seus respectivos controles não irradiados. Como os níveis basais de Rad51 e BRCA2 detectados foram menores nas linhagens ancestrais, podemos inferir que os níveis totais de mRNA para os genes após a irradiação são menores para as cepas Silvio e Esmeraldo quando comparados com a cepa CI Brener.

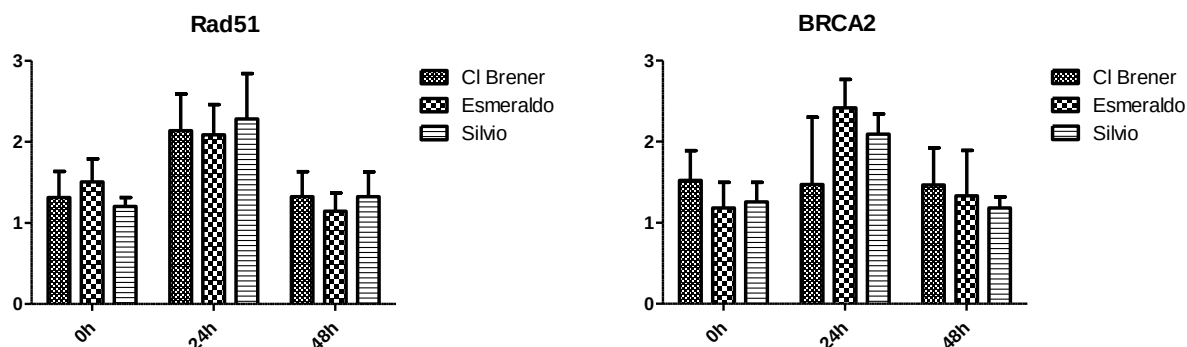


Figura 21 - Comparação do aumento entre as cepas irradiadas e não-irradiadas – A comparação do aumento observado quando se compara as cepas irradiadas com seu controle não irradiado mostra que o aumento observado foi da mesma ordem para todas, sem diferença significativa.

4.7. A presença de cafeína causa atraso na resposta à irradiação ionizante

A resposta à radiação ionizante inclui elementos além do reparo. Um fator importante para a resposta ao dano ao DNA (DDR) é a sinalização celular mediada pelas proteínas membros da família das fosfatidilinositol 3 quinases ATM e ATR. A proteína ATR possui papel fundamental durante esta resposta a partir de sua ativação pela proteína RPA a partir da ligação desta com filamentos de ssDNA. Para testar a influência destas vias de sinalização envolvidas na resposta contra radiação ionizante, utilizamos cafeína, um inibidor da via ATM/ATR (Figura 22).

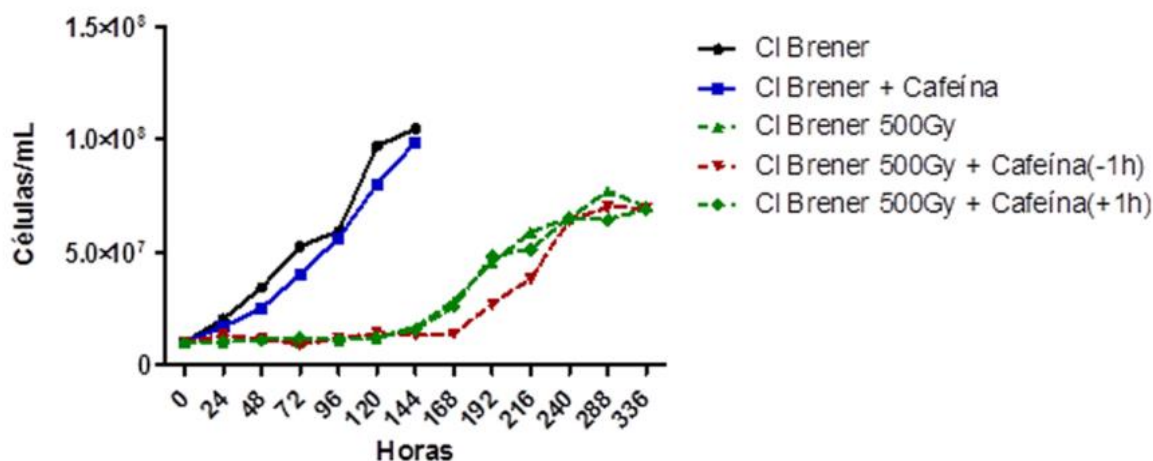


Figura 22 - Curva de crescimento após tratamento com cafeína e irradiação com 500Gy de radiação ionizante— O tratamento com 5mM de cafeína ocasionou um atraso no crescimento com o tratamento prévio com cafeína. A adição de cafeína logo após a irradiação não é capaz de causar o mesmo fenótipo, sugerindo que a sinalização para a quebra de DNA ocorre rapidamente após a exposição à radiação ionizante.

Primeiramente foi feito um tratamento prévio e um tratamento posterior com 5mM de cafeína com a cepa CI Brener antes e após a exposição à 500Gy de radiação ionizante. Como observado na figura 22, o tratamento após a exposição à radiação ionizante não é capaz de alterar o fenótipo de retomada de crescimento. Porém, quando pré-tratadas por uma hora, e irradiadas na presença de cafeína, ocorreu um atraso na retomada de crescimento. O mesmo padrão foi observado quando o experimento foi repetido nas mesmas condições para as cepas Silvio e Esmeraldo (Figura 23).

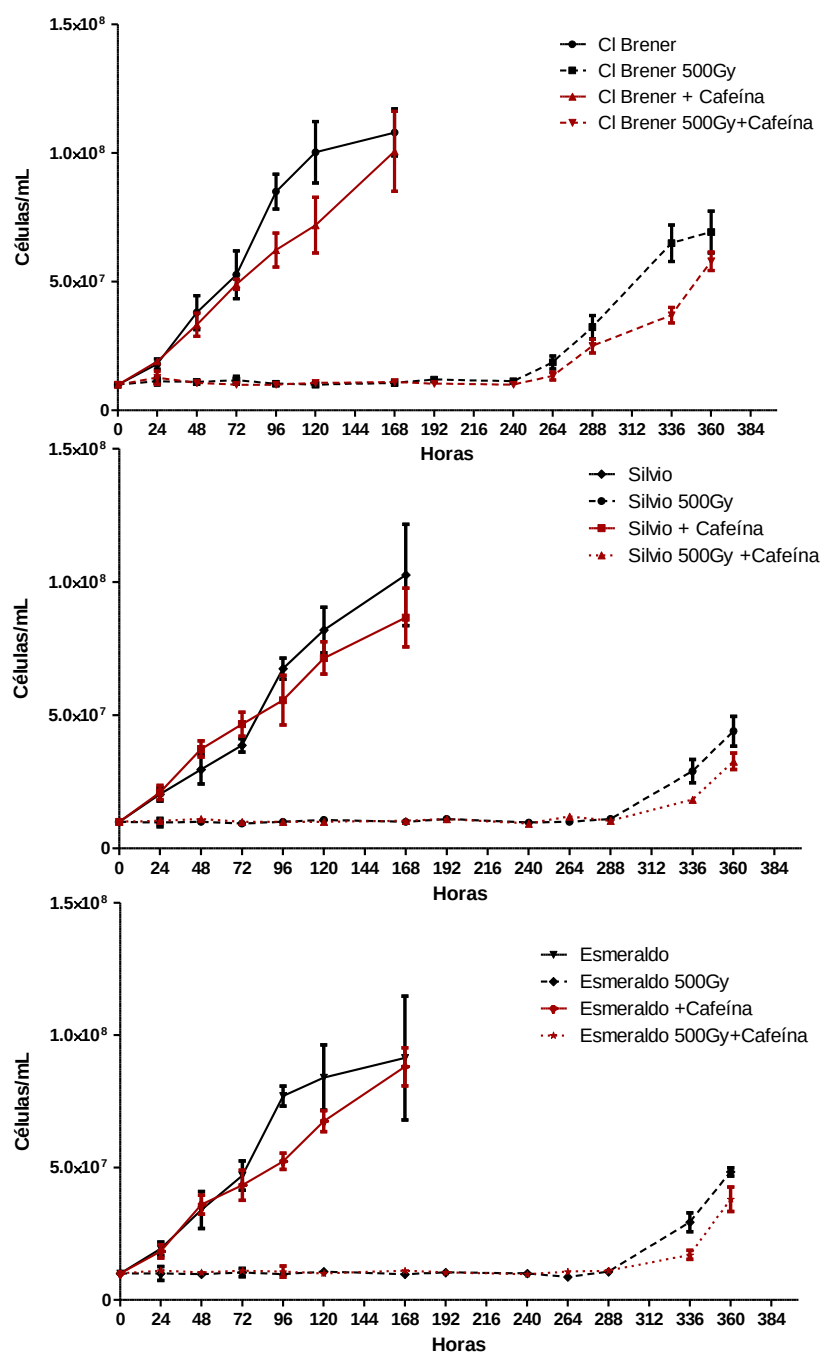


Figura 23 - Curva de crescimento de diferentes linhagens pré-tratadas com cafeína e expostas à 500Gy de radiação ionizante – O mesmo padrão de atraso no crescimento com um tratamento prévio de cafeína foi observado para as cepas Silvo e Esmeraldo. Todas as três cepas apresentaram um atraso de cerca de um dia na retomada do crescimento quando foram tratadas e irradiadas na presença de 5mM de cafeína

5. Discussão

Em organismos eucariotos e procariotos a capacidade de recuperar informações perdidas por quebras na fita de DNA é essencial e uma das fontes de geração de variabilidade entre os organismos (Heyer 2007). Provas da importância desta via de metabolismo de DNA são a presença de proteínas homólogas destas vias nos mais diversos táxons. Em bactérias, por exemplo, o processo de recombinação tem início com a invasão de uma fita pela outra em busca de homologia, em uma etapa catalisada pela proteína RecA. Homólogos desta proteína, bem como de outras proteínas envolvidas no processo, são encontrados em diversos outros procariotos, apresentando uma alta conservação entre estes organismos (Rocha et al. 2005).

A variedade de sintomas da Doença de Chagas pode estar relacionada com características da estrutura populacional do parasito (além de aspectos do próprio hospedeiro) (Macedo et al. 2004). Características como o tropismo tecidual, as diversas manifestações clínicas da doença podem ser relacionados com sua estrutura populacional (Prata 2001; Macedo et al. 2004; Zingales et al. 2012). Apesar de vários estudos relacionados com a estrutura populacional de *Trypanosoma cruzi*, ainda existem vários aspectos que permanecem não-resolvidos, como a posição de determinadas linhagens específicas no quadro evolutivo do táxon. Apesar de tido como um evento raro, existem evidências de que a recombinação e troca gênica ocorrem no *Trypanosoma cruzi* (Baptista et al. 2014; Gaunt et al. 2003) e, portanto, entender o processo de recombinação em *Trypanosoma cruzi* pode ajudar a elucidar estas relações entre a variabilidade genética e a de sintomas.

Trabalhos envolvendo tripanossomatídeos já demonstraram que estes organismos apresentam algumas peculiaridades com relação ao reparo por recombinação homóloga. *Trypanosoma cruzi* apresenta uma alta resistência à radiação ionizante, suportando altas doses de raios gama quando comparados com outros organismos. Quando expostos à doses de 200Gy, 500Gy e 1kGy o parasito apresenta um fenótipo de parada do crescimento. Este crescimento é, após um tempo variável, retomado até que a cultura atinja novamente seu platô (Passos-Silva 2010). Quando comparados com seu controle, parasitos que superexpressam a proteína RAD51 são capazes de recuperar seu crescimento mais rapidamente e são também capazes de reparar mais rapidamente as quebras geradas no DNA devido à radiação (Regis-da-Silva et al. 2006). Estes trabalhos foram feitos utilizando-se a cepa híbrida de *Trypanosoma cruzi* Cl Brener. Visando investigar possíveis diferenças entre as respostas à radiação ionizante de linhagens híbridas e não-híbridas do parasito, foram realizados estudos com outras cepas do parasito, além da cepa Cl Brener.

Em nossos experimentos fomos capazes de detectar uma diferença significativa na resposta à geração de quebra de fitas dupla entre cepas de linhagens distintas do parasito. A cepa híbrida CI Brener consegue retomar seu crescimento de forma mais rápida que todas as outras cepas de linhagens não-híbridas analisadas. Quando comparada com as cepas Silvio e Dm28c (da DTU T. cruzi I), Esmeraldo e Y (da DTU T. cruzi II) e 231 (pertencente à DTU T. cruzi III) foi observado que o tempo de parada após a irradiação é menor para CI Brener. A exposição à radiação ionizante, além de causar quebra de fitas dupla, pode gerar também modificações em outras moléculas. Uma possível consequência é a geração de estresse oxidativo a partir da geração do radical hidroxila ($\text{HO}^\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (UNSCEAR 2000). Os mecanismos precisos pelos quais estas moléculas causam danos à aminoácidos e nucleotídeos ainda são muito estudados. Uma forma de minimizar a geração destes radicais é a utilização de fontes de radiação de baixa energia de transferência, tais como as fontes de raios gama que são capazes de atravessar tecidos gerando menos estresse oxidativo que radiações de alta transferência de energia (Xue et al. 2015). Nossa fonte de radiação utiliza um isótopo de cobalto para gerar raios gama, sendo uma fonte de baixa energia de transferência e, portanto, gerando menos radicais livres para estressar o parasito.

Como o parasito não possui a via de junção de pontas não-homólogas (Passos-Silva et al. 2010), podemos assumir que as quebras de fita dupla geradas pela radiação ionizante serão reparadas pela via de reparo por recombinação homóloga. Todos os genes foram analisados para as cepas CI Brener, Silvio e Esmeraldo (cepas que possuíam o genoma depositados no banco de dados TriTryp). Não foram encontrados os genes XRCC4 e DNA Ligase IV em nenhuma das cepas, confirmando a ausência da via de junção de pontas não-homólogas nestes parasitos.

Na análise dos genes envolvidos no reparo por recombinação homóloga foram encontradas diferenças entre as três cepas. A maioria destas diferenças, porém, não foram capazes de alterar de forma significativa a estrutura das proteínas entre as cepas. Duas características chamaram a atenção nas análises. A primeira foi a conservação total da sequência de aminoácidos da proteína Rad51 para todas as cepas. A alta conservação desta proteína é um sinal da importância do reparo por recombinação em todos os organismos. Estudos com o homólogo RecA em bactérias mostraram que estas proteínas possuem um alto grau de conservação entre elas, e não foram encontradas famílias de bactérias que não possuam ela ou algum homólogo funcional. A análise de regressão da proteína RecA nestas bactéria também mostrou que de todos os homólogos envolvidos no processo de recombinação encontrados pelo estudo, ela possuía menos substituições quando comparadas com as outras proteínas (Rocha et al. 2005). A sequência da proteína

Rad51 de *Trypanosoma cruzi* quando alinhada com as sequências de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* apresenta algumas diferenças, principalmente em sua porção inicial, porém ela é consensual em 89,77% dos aminoácidos (dados não mostrados). Essa alta conservação entre as cepas de *Trypanosoma cruzi* com seus grupos irmãos evidencia a importância dela para a sobrevivência dos organismos.

A análise do gene BRCA2 demonstrou que o número de motivos BRC é variável entre as cepas. As cepas CI Brener e Esmeraldo possuem dois motivos BRC, ao passo que a cepa Silvio apenas um motivo. Os motivos BRC são bastante variáveis entre os organismos. *Trypanosoma brucei* por exemplo, possui cerca de 15 motivos BRC em sua proteína BRCA2, ao passo que *Leishmania major* apenas um (Hartley & McCulloch 2008). O número de motivos BRC é variável entre os organismos. A proteína BRCA2 de camundongos e humana possuem 8 motivos BRC, nem todos com função esclarecida (Lou et al. 2014). A função clássica demonstrada para estes motivos é fazer o carregamento da proteína Rad51 para a formação do filamento nucleoproteico durante o início do processo de reparo (Patel et al. 1998), porém existem evidências de outras funções associadas à estes motivos. A deleção de motivos em conjunto da proteína BRCA2 de camundongos revelou que eles podem possuir funções distintas envolvidas diretamente com o reparo, a proteção da degradação de Rad51 pela maquinaria celular e até mesmo funções relacionadas à sinalização de reparo (Saha et al. 2013; Gudmundsdottir & Ashworth 2006; Heyer et al. 2010). Os trabalhos, porém, não conseguem explicar como se dá a escolha do motivo BRC a ser ligado. Em sua função clássica, o motivo BRC é o local de ligação da proteína Rad51 à BRCA2. É a partir dele que BRCA2 consegue desestabilizar os oligômeros de Rad51, se ligar à monômeros da proteína e realizar seu carregamento no filamento de DNA, desligando a proteína Rad51 e deslocando a proteína RPA do filamento de fita simples no local de quebra (Pellegrini et al. 2002).

Nossas análises também mostraram que os motivos BRC estão em posições distintas para as três proteínas. Os primeiros motivos BRC da proteína da cepa CI Brener e Esmeraldo encontram-se em posições de acessibilidade e conformação variável. O motivo único da proteína da cepa Silvio se encontra em uma posição semelhante ao segundo motivo BRC das cepas Esmeraldo e CI Brener. A análise da interação entre esses motivos revelou que a ligação no segundo motivo BRC de Esmeraldo e CI Brener parece ser favorecida. Além disso, essa predição mostrou que a ligação da proteína ao motivo BRC de Silvio e ao segundo motivo de Esmeraldo é mais estável que a ligação ao segundo motivo BRC de CI Brener. Apesar de ser necessário a confirmação experimental destas previsões, este fato poderia estar relacionado com o tempo maior de retomada de crescimento do parasito. Uma ligação mais estável da proteína nas cepas Silvio e Esmeraldo poderia

dificultar ou alterar a dinâmica de carregamento de Rad51 no filamento de quebra. A presença dos motivos BRC a mais nas proteínas de CI Brener e Esmeraldo poderiam estar relacionadas com outras funções além do simples carregamento de Rad51 no local de quebra, e não participar diretamente desta função. É necessário, porém, a validação experimental das previsões de interação feitas no trabalho.

A PCR em tempo real mostrou que também existem diferenças entre as cepas estudadas. Após a irradiação ocorreu um aumento no número de transcritos em todas elas. Esta observação condiz com o encontrado na literatura, em que há um aumento de Rad51 de cerca de 2 vezes 24 horas após a irradiação (Regis-da-Silva et al. 2006). Este aumento, porém, não é estatisticamente diferente quando comparamos as cepas. O aumento relativo de cada uma foi o mesmo (cerca de 2 vezes após 24 horas). A análise das cepas não-irradiadas demonstrou que elas possuem um nível basal de transcritos estatisticamente menor que a cepa CI Brener. Este nível basal poderia estar relacionado com a resposta imediata ao dano gerado pela radiação ionizante. Os níveis de BRCA2 detectados foram menores que os níveis detectados de Rad51, porém este fato está de acordo com a literatura que descreve que os níveis de BRCA2 são cerca de 4 vezes menores que os níveis de Rad51 para determinados organismos (Magwood et al. 2013).

Este nível basal menor, juntamente com o mesmo aumento observado para todas as cepas, significaria que, após a irradiação, os níveis de CI Brener ainda continuariam maiores que os níveis das cepas não-híbridas Esmeraldo e Silvio. Já foi descrito que a superexpressão da proteína Rad51 faz com que o fenótipo de saída após a irradiação seja adiantado, ao passo que um parasita heminocaute para a proteína tem sua saída atrasada quando comparado com a cepa selvagem (Regis-da-Silva et al. 2006; Passos-Silva 2010). Os dados encontrados por nós confirmam a importância da proteína para esta saída. Um nível menor de transcritos para Rad51 após a irradiação das cepas Silvio e Esmeraldo poderia explicar o fenótipo de atraso observado. Assim como o parasito da cepa CI Brener heminocaute para a proteína Rad51, estas cepas também teriam dificuldades para lidar com a exposição à radiação ionizante, atrasando sua retomada de crescimento.

Ainda que existam mecanismos de controle pós-traducionais importantes na resposta à radiação ionizante em *Trypanosoma cruzi* (Cerqueira 2014) e em outros organismos (Abraham et al. 2000; Xie et al. 2010), um nível basal de transcritos poderia ser significativo na resposta dos parasitos à radiação ionizante. Para confirmar esta hipótese seria necessário verificar o nível das proteínas nestes mesmos tempos após a irradiação.

O parasito também apresenta uma parada longa mesmo após ter ocorrido o reparo das quebras no DNA. Uma causa para este fenômeno pode estar na complexidade da resposta

à radiação ionizante. O parasito é capaz de alterar seus perfis de transcritos (Grynberg et al. 2012) e níveis de proteína quando exposto à irradiação (Vieira et al. 2014). Quando tratados com inibidores de tradução (como puromicina e cicloheximida), parasitos irradiados têm um atraso maior para a retomada do ciclo, além de ser possível perceber morte celular nestas culturas (Graziele & Vieira 2014). A degradação de proteínas pelo proteassomo também tem papel importante na resposta do parasito. O envolvimento do proteassomo neste tipo de resposta é bem descrito na literatura. Em *Trypanosoma cruzi* o tratamento com inibidores de proteassomo também causou um atraso na retomada do crescimento do parasito após a exposição à radiação ionizante. A translocação para o núcleo nos mesmos tempos que é observado o mesmo efeito para a proteína Rad51 sugerem um papel central do proteassomo no reparo por recombinação homóloga (Cerqueira 2014).

Outro aspecto importante para o estudo do processo de reparo de recombinação diz respeito à sinalização celular. A parada após um longo tempo mesmo depois que o reparo já foi realizado que o parasito apresenta é peculiar e especulamos se processos de sinalização poderiam estar relacionados com esta parada. Os mecanismos de controle e sinalização para as vias de reparo ainda não são bem estudados em *Trypanosoma cruzi*. A sinalização para o reparo de quebra de fitas duplas passa pela ativação de ATM e ATR. A ativação da proteína ATM é iniciada quando o complexo MRN reconhece o sítio de lesão. Na ligação deste complexo ocorre a ativação da proteína ATM (possivelmente a partir da proteína NBS1 do complexo) (Adams et al. 2006). Após a ativação de ATM ocorre o complexo gera filamento de fitas simples de DNA para a continuidade do processo de reparo por recombinação homóloga. Estes filamentos de fita simples são ligados à proteína RPA, e essa ligação é substrato para a ativação da via de ATR (Saha et al. 2013). Apesar de não se conhecer o mecanismo exato, sabe-se que a cafeína é um inibidor de ATM e ATR.

Em nossos experimentos foi mostrado que o tratamento com cafeína antes da exposição à radiação ionizante foi capaz de atrasar a resposta em todas as cepas testadas. Quando a inibição foi feita uma hora após a irradiação, não foi observado alteração no fenótipo de retomada do crescimento. Estes resultados nos permitem concluir que a cascata de sinalização é importante para a recuperação do parasito. Além disso, esta sinalização é rápida e ocorre logo após a irradiação. Outros organismos, quando tratados com inibidores específicos de ATM e ATR e com diferentes tipos de radiação ionizante, apresentam fenótipos distintos. Radiações de alta transferência de energia geram quebras mais complexas, levando à uma ativação por tempo maior de ATM e ATR (Saha et al. 2013). É dito que a via de ATR funciona de forma a causar uma parada precoce do ciclo celular na transição da fase G2 para M em células deficientes ou silenciadas para o gene ATM (Xue et al. 2015). A inibição causada pela cafeína poderia inibir ATM e ATR, causando um atraso na

sinalização de reparo no início do processo de ressecção. Esse atraso na sinalização pode estar relacionado com o atraso na retomada do ciclo celular. Porém, novos estudos são necessários para compreender se há alterações no ciclo celular destas células, além da utilização de inibidores específicos para cada uma das vias de sinalização.

Uma das vias de ativação para a cascata de sinalização mediada por ATM e ATR envolve a ressecção do DNA pelo complexo MRN (ou proteínas homólogas ao complexo). O complexo, a partir de sua subunidade formada pela proteína NBS1, é capaz de fosforilar e ativar a proteína ATM. Esta ativação de ATM leva a um aumento do processo de ressecção em uma cascata ainda não bem estabelecida. Este aumento levaria à geração de mais filamentos de fita simples, ao qual se ligaria a proteína RPA. A ligação de RPA é um sinal para a ativação de ATR, levando à uma troca da via de ATM para a via de ATR, que levaria à novas cascatas de sinalização para determinar a via metabólica escolhida pela célula: vias de reparo ou vias de apoptose (Heyer et al. 2010; Saha et al. 2013). Quebras de fita mais complexas, como as geradas por radiações de alta energia de transferência, assim como a inibição de proteínas envolvidas neste processo, levam a alterações no ciclo celular (Xue et al. 2015).

O atraso observado decorrente do tratamento de cafeína foi semelhante para as três cepas estudadas. Apesar da cafeína ser um inibidor inespecífico da via de ATM/ATR, as três cepas apresentaram o mesmo atraso no crescimento (de cerca de um dia). Este efeito semelhante para todas as cepas poderia estar relacionado com as proteínas da via de recombinação homóloga envolvidas nestas sinalizações (Mre11, Rad50, NBS1 e RPA). Nenhuma delas apresentou modificações relevantes entre as cepas para as predições feitas em nosso trabalho. Esta semelhança entre as cepas com relação ao complexo MRN e à proteína RPA pode estar relacionada com o mesmo efeito observado. Possivelmente, a capacidade de ressecção e da sinalização resultante desta ressecção não deve ser significativamente diferente entre elas. Devido à problemas nas sequências depositadas no banco de dados, não foi possível recuperar a sequência das proteínas ATM e ATR para a comparação entre as três cepas.

Estes resultados mostram a complexidade da resposta ao dano ao DNA causado pela radiação ionizante. *Trypanosoma cruzi* apresenta algumas características peculiares com relação à esta resposta. Ele é capaz de resistir a altas doses de radiação e apresenta um fenótipo de parada característico para cada cepa. As cepas híbridas são capazes de responder mais rapidamente à estas quebras que cepas ancestrais. Esta resposta pode estar relacionada tanto com a interação entre suas proteínas, quanto com os níveis de expressão aumentados para a cepa híbrida. Além disso, a resposta à radiação ionizante é

complexa, envolvendo grandes alterações no metabolismo e a integração de vias de sinalização e degradação de proteínas. A importância da sinalização é evidenciada pelo atraso da resposta que é observado quando as vias são inibidas. Afim de melhorar a compreensão deste fenômeno serão realizados experimentos para verificar se o tempo de reparo das cepas não-híbridas é diferente do tempo de reparo das cepas híbridas, além de análises de ciclo celular após a inibição de vias de sinalização e estudos com relação a interação entre as proteínas chaves do processo.

6. Conclusões

- A resposta aos danos gerados pela radiação ionizante é variável e dependente da cepa em questão.
- Esta variação parece estar relacionada com a história evolutiva das linhagens, já que cepas não-híbridas possuem um atraso na retomada de crescimento após a irradiação quando comparadas com a cepa híbrida CI Brener.
- Existem diferenças entre os genes de reparo das três cepas. Algumas dessas diferenças podem resultar em diferenças estruturais e de interação entre as proteínas envolvidas no reparo. Abordagens de bioinformática permitem prever como seria a interação entre estas proteínas, porém estes dados precisam de validação em bancada.
- Cepas não-híbridas apresentam menor nível basal de transcritos dos dois principais genes envolvidos no reparo por recombinação homóloga (Rad51 e BRCA2).
- Apesar de todas as cepas apresentarem a indução e um aumento de 2 vezes nos níveis de transcritos de Rad51 e BRCA2, ele não é suficiente para compensar os níveis basais menores de cepas não-híbridas quando comparadas com a cepa híbrida CI Brener.
- A sinalização para o reparo ocorre rapidamente, até uma hora após à exposição ao dano, já que a inibição de vias de sinalização não parece surtir efeito quando é feita neste intervalo de tempo. Porém, a inibição anterior à irradiação é capaz de causar um pequeno atraso na retomada de crescimento do parasito.
- O atraso observado na retomada de crescimento causado pela inibição por cafeína é semelhante nas três cepas. Este resultado pode estar relacionado com a semelhança entre as proteínas da via de recombinação homóloga envolvidas no processo de sinalização para a resposta ao dano ao DNA.

7. Bibliografia

- Abraham, J. et al., 2000. Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analyzed by mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*, 295(4), pp.853–864. Available at: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK7-45F4TYF-3F&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7d14ae89200d3c38fa3d25e62aa4ad5a\http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/quer.
- Adams, K.E. et al., 2006. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene*, 25(28), pp.3894–904.
- Aguiar, P. & Furtado, C., 2013. Oxidative stress and DNA lesions: The role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS neglected tropical ...*, 7(6). Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002279.g008> [Accessed May 23, 2014].
- Andrade, L.O. et al., 2010. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: An in vitro study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), pp.834–837.
- Andrade, L.O. et al., 2002. *Trypanosoma cruzi*: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental Parasitology*, 100(4), pp.269–275.
- Annonymous, 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, pp.429–432.
- Araújo, P.R. et al., 2011. Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. *Parasitology International*, 60(2), pp.161–169. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.01.006>.
- Azuaje, F.J., Ramirez, J.L. & Da Silveira, J.F., 2007. In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Kinetoplastid biology and disease*, 6, p.6.
- Baptista, R. de P. et al., 2014. Evidence of substantial recombination among *Trypanosoma cruzi* II strains from Minas Gerais. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 22, pp.183–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296011> [Accessed May 15, 2014].
- Bartholomeu, D.C. et al., 2009. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, 37(10), pp.3407–3417.
- Bellera, C.L. et al., 2013. Application of computer-aided drug repurposing in the search of new cruzipain inhibitors: Discovery of amiodarone and bromocriptine inhibitory effects. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp.2402–2408.
- Bensimon, A., Aebersold, R. & Shiloh, Y., 2011. Beyond ATM: The protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Letters*, 585(11), pp.1625–1639. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.013>.

- Breimer, L.H., 1988. Ionizing radiation-induced mutagenesis. *British journal of cancer*, 57(1), pp.6–18.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2246688&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Brener, Z., 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, 27, pp.347–382.
- Brisse, S. et al., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 2(3), pp.173–83.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797979>.
- Brisse, S., Barnabé, C. & Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, 30(1), pp.35–44.
- Brisse, S., Dujardin, J.C. & Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111(1), pp.95–105.
- Burgos, J.M. et al., 2013. Differential Distribution of Genes Encoding the Virulence Factor Trans-Sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units. *PLoS ONE*, 8(3), pp.9–11.
- Burgos, J.M. et al., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 37(12), pp.1319–1327.
- Buscaglia, C. a. & Di Noia, J.M., 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, 5(5), pp.419–427.
- Cavalcanti, D.P. et al., 2009. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC microbiology*, 9, p.120.
- Cerqueira, P.G., 2014. *O papel do proteassomo na recombinação homóloga em Trypanosoma cruzi*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Chagas, C., 1909. Chagas, nova tripanozomíase humana Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. , p.70.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G. & Boulton, S.J., 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), pp.497–510. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>.
- Cline, S.D. & Hanawalt, P.C., 2003. Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(5), pp.361–72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728270> [Accessed October 24, 2014].
- Eker, a. P.M. et al., 2009. Direct DNA damage reversal: Elegant solutions for nasty problems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), pp.968–980.

- El-Sayed, N.M. et al., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), pp.409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725> [Accessed May 23, 2014].
- Esashi, F. et al., 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 434(7033), pp.598–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800615>.
- Eswar, N. et al., 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 2, p.Unit 2.9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429317>.
- Fanning, E., Klimovich, V. & Nager, A.R., 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Research*, 34(15), pp.4126–4137.
- Filardi, L.S. & Brener, Z., 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5), pp.755–9.
- Fortin, G.S. & Symington, L.S., 2002. Mutations in yeast Rad51 that partially bypass the requirement for Rad55 and Rad57 in DNA repair by increasing the stability of Rad51-DNA complexes. *The EMBO journal*, 21(12), pp.3160–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Frasch, a C., 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today (Personal ed.)*, 16(7), pp.282–6.
- Freitas, J.M. et al., 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International Journal for Parasitology*, 35(4), pp.411–417.
- De Freitas, J.M. et al., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2(3), pp.0226–0235.
- Fry, R.C., Begley, T.J. & Samson, L.D., 2005. Genome-wide responses to DNA-damaging agents. *Annual review of microbiology*, 59, pp.357–377.
- Gaunt, M.W. et al., 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. , 421(February).
- Graziele, H. & Vieira, S., 2014. *Caracterização do perfil proteico e da atividade mitocondrial de Trypanosoma cruzi sob o estresse da radiação gama*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Grynberg, P. et al., 2012. *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. *PloS one*, 7(1), p.e29596. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256153&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed January 21, 2014].

- Gudmundsdottir, K. & Ashworth, a, 2006. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 25(43), pp.5864–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998501> [Accessed January 21, 2014].
- Harper, J.W. & Elledge, S.J., 2007. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell*, 28(5), pp.739–745.
- Hartley, C.L. & McCulloch, R., 2008. Trypanosoma brucei BRCA2 acts in antigenic variation and has undergone a recent expansion in BRC repeat number that is important during homologous recombination. *Molecular microbiology*, 68(5), pp.1237–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2408642&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed January 21, 2014].
- Heyer, W.D., 2007. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. *Topics in Current Genetics*, 17, pp.251–283.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T. & Liu, J., 2010. Regulation of Homologous Recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics*, 244(6), pp.113–139.
- Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, pp.366–374.
- Horn, D. & McCulloch, R., 2010. Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6), pp.700–705. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.009>.
- Hotez, P.J. et al., 2012. Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas.” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), pp.4–7.
- Jankovic, M., Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M.C., 2007. Antigen receptor diversification and chromosome translocations. *Nature immunology*, 8(8), pp.801–808.
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H. & van Gent, D.C., 1998. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in cell biology*, 8(12), pp.483–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861670>.
- Kowalczykowski, S.C. et al., 1994. Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli. *Microbiological reviews*, 58(3), pp.401–465.
- Krokan, H.E., Drabløs, F. & Slupphaug, G., 2002. Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene*, 21(58), pp.8935–8948.
- Laskowski, R.A. et al., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), pp.283–291.
- Li, G.-M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*, 18(1), pp.85–98.
- Li, X. & Heyer, W.-D., 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research*, 18(1), pp.99–113. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3087377&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed January 21, 2014].

- Lieber, M.R. et al., 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(9), pp.712–720.
- Liu, Y. et al., 2003. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp.4191–4196.
- Lo, T. et al., 2003. Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51: implications for DNA repair and cancer. *DNA Repair*, 2(9), pp.1015–1028. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786403000971> [Accessed June 11, 2014].
- Lord, C.J. & Ashworth, A., 2007. RAD51, BRCA2 and DNA repair: a partial resolution. *Nature structural & molecular biology*, 14(6), pp.461–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17549079>.
- Lou, D.I. et al., 2014. Rapid evolution of BRCA1 and BRCA2 in humans and other primates. *BMC evolutionary biology*, 14(1), p.155. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011685> [Accessed July 13, 2014].
- Macedo, A.M. et al., 2004. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(1), pp.1–12.
- Magwood, A.C. et al., 2013. Endogenous levels of Rad51 and Brca2 are required for homologous recombination and regulated by homeostatic re-balancing. *DNA Repair*, 12(12), pp.1122–1133. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.10.006>.
- Marteijn, J. a et al., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), pp.465–481.
- McCulloch, R. & Barry, J.D., 1999. A role for RAD51 and homologous recombination in Trypanosoma brucei antigenic variation. *Genes and Development*, 13(21), pp.2875–2888.
- McKean, P.G. et al., 2001. Identification and characterisation of a RAD51 gene from Leishmania major. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), pp.209–216.
- Mejia, A.M. et al., 2012. Benznidazole-resistance in trypanosoma cruzi is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *Journal of Infectious Diseases*, 206(2), pp.220–228.
- Mimitou, E.P. & Symington, L.S., 2009. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(5), pp.264–272.
- Passos-Silva, D.G., 2010. *Estudos do papel do gene RAD51 de Tripanosomatídeos na recombinação e reparo de DNA*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Passos-Silva, D.G. et al., 2010. Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. *Journal of nucleic acids*, 2010, p.840768. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2952945&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed January 21, 2014].

- Patel, K.J. et al., 1998. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Molecular cell*, 1(3), pp.347–357.
- Pellegrini, L. et al., 2002. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420(6913), pp.287–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442171>.
- Pluskota-Karwatka, D., 2008. Modifications of nucleosides by endogenous mutagens-DNA adducts arising from cellular processes. *Bioorganic Chemistry*, 36(4), pp.198–213.
- Prakash, S., Johnson, R.E. & Prakash, L., 2005. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.317–353.
- Prata, a, 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, 1(2), pp.92–100.
- Rajão, M.A. et al., 2014. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(4), pp.309–321.
- Rassi, A. & Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), pp.1388–402.
- Regis-da-Silva, C.G. et al., 2006. 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*, 149(2), pp.191–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828179> [Accessed June 1, 2013].
- Renkawitz, J., Lademann, C. a & Jentsch, S., 2014. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(6), pp.369–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24824069> [Accessed July 10, 2014].
- Rocha, E.P.C., Cornet, E. & Michel, B., 2005. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS genetics*, 1(2), p.e15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1193525&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed May 23, 2014].
- Saha, J., Wang, M. & Cucinotta, F. a., 2013. Investigation of switch from ATM to ATR signaling at the sites of DNA damage induced by low and high LET radiation. *DNA Repair*, 12(12), pp.1143–1151. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.10.004>.
- Samach, A. et al., 2011. Identification of plant RAD52 homologs and characterization of the *Arabidopsis thaliana* RAD52-like genes. *The Plant cell*, 23(12), pp.4266–79. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3269865&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed May 23, 2014].
- Silva Paes, L. et al., 2011. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas' Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 17(20), pp.2074–2099.
- Simpson, L. et al., 1980. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29, pp.1053–1063. Available at: [http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab publications/LS-32-37.pdf](http://dna.kdna.ucla.edu/simpsonlab/Lab%20publications/LS-32-37.pdf).

- Sung, P. & Klein, H., 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(10), pp.739–750.
- Tan, K.S.W., Leal, S.T.G. & Cross, G. a M., 2002. Trypanosoma brucei MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Molecular and biochemical parasitology*, 125(1-2), pp.11–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467970>.
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International journal for parasitology*, 28(1), pp.85–104.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J., 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, 18(9), pp.405–410.
- UNSCEAR, 2000. *Sources and Effects of Ionizing Radiation*,
- Unsear, 2010a. *Sources And Effects Of ionizing Radiation - Exposures of The Public And Workers From Various Sources Of Radiation - UNSCEAR 2008 Report*, Available at: http://www.unscear.org/docs/reports/2008/09-86753_Report_2008_Annex_B.pdf.
- Unsear, 2010b. *Sources And Effects Of ionizing Radiation - Exposures of The Public And Workers From Various Sources Of Radiation - UNSCEAR 2008 Report*,
- Vieira, H.G.S. et al., 2014. Proteomic Analysis of Trypanosoma cruzi Response to Ionizing Radiation Stress. *PloS one*, 9(5), p.e97526. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026238&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed May 23, 2014].
- De Vries, S.J., van Dijk, M. & Bonvin, A.M.J.J., 2010. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols*, 5(5), pp.883–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431534> [Accessed May 23, 2014].
- Wang, J.Y., 1998. Cellular responses to DNA damage. *Current opinion in cell biology*, 10, pp.240–247.
- Westenberger, S.J. et al., 2005. Two hybridization events define the population structure of Trypanosoma cruzi. *Genetics*, 171(2), pp.527–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1456769&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Wong, A.K.C. et al., 1997. RAD51 Interacts with the Evolutionarily Conserved BRC Motifs in the Human Breast. *The Journal of Biochemistry*, pp.1–4.
- Wu, Y. et al., 2008. Rad51 protein controls Rad52-mediated DNA annealing. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), pp.14883–14892.
- Xie, A. et al., 2010. H2AX post-translational modifications in the ionizing radiation response and homologous recombination. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(17), pp.3602–3610.
- Xu, J. & Zhang, Y., 2010. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*, 26(7), pp.889–895.

- Xue, L. et al., 2015. The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. *DNA Repair*, 25, pp.72–83.
- Yonetani, Y. et al., 2005. Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 33(14), pp.4544–4552.
- Zhang, Y. & Skolnick, J., 2005. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Research*, 33(7), pp.2302–2309.
- Zhou, B.S. & Elledge, S.J., 2000. Checkpoints in perspective. *Nature*, 408(November), pp.433–439.
- Zingales, B. et al., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp.1051–1054.
- Zingales, B. et al., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), pp.240–53.
- Zuma, A.A. et al., 2011. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International journal of antimicrobial agents*, 37(5), pp.449–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292448> [Accessed March 28, 2012].