

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

Amanda Carolina da Silva Nunes

**Análise de híbridos de diferentes DTUs de *Trypanosoma cruzi***

**Belo Horizonte**

**2023**

Amanda Carolina da Silva Nunes

**Análise de híbridos de diferentes DTUs de *Trypanosoma cruzi***

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

Orientador: Carlos Renato Machado

**Belo Horizonte**

**2023**

043 Nunes, Amanda Carolina da Silva.

Análise de híbridos de diferentes DTUs de *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Amanda Carolina da Silva Nunes. – 2023.

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

Orientador: Carlos Renato Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética, Ecologia e Evolução.

1. Genética. 2. Termo. 3. Termo. 4. Termo. I. Machado, Carlos Renato. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Genética

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

<b>ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>	<b>335/2023</b>
<b>Amanda Carolina Silva Nunes</b>	<b>Entrada</b>

Às quatorze horas do dia **05 de abril de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Análise de híbridos de diferentes DTUs de *Trypanosoma cruzi***", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Carlos Renato Machado**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>CPF</b>	<b>Indicação</b>
Carlos Renato Machado	UFMG	710.558.866-72	APROVADA
Francisco Pereira Lobo	UFMG	012.273.736-94	APROVADA

Silvane Maria Fonseca Murta	FIOCRUZ	817.194.696-87	APROVADA
-----------------------------	---------	----------------	----------

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 05 de abril de 2023.**

Carlos Renato Machado  
Francisco Pereira Lobo  
Silvane Maria Fonseca Murta



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Renato Machado, Chefe**, em 05/04/2023, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2023, às 19:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Silvane Maria Fonseca Murta, Usuária Externa**, em 06/04/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto](#)

---

[nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2201970** e o código CRC **4FB209FD**.

---

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas Programa de  
Pós-Graduação em Genética

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"Análise de híbridos de diferentes DTUs de *Trypanosoma cruzi*"**

**Amanda Carolina Silva Nunes**

**Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:**

Carlos Renato Machado  
UFMG

Francisco Pereira Lobo  
UFMG

Silvane Maria Fonseca Murta  
FIOCRUZ

**Belo Horizonte, 05 de abril de 2023.**



---

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Renato Machado, Chefe**, em 05/04/2023, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2023, às 19:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Silvane Maria Fonseca Murta, Usuária Externa**, em 06/04/2023, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



---

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2202002** e o código CRC **A1A7477F**.

---

---





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Genética

**Certidão nº 2/2023/ICB-SECCPGGEN-UFMG**

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO E FOLHA DE APROVAÇÃO**

**RETIFICAÇÃO - DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

O Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais RETIFICA a **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 335/2023** e a **FOLHA DE APROVAÇÃO de 05 de abril de 2023** nos seguintes termos:

Onde se lê "Amanda Carolina Silva Nunes" leia-se "Amanda Carolina **da** Silva Nunes".

Belo Horizonte, 23 de Outubro de 2023.

Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rizzatti Luizon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 23/10/2023, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2737798** e o código CRC**F4C3AD71**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, cuja bondade me guiou até aqui. Agradeço também ao meu orientador, o prof. O Dr. Carlos Renato Machado, pela oportunidade de fazer parte do Grupo de Reparo e do LGB, por todos os ensinamentos, todas as discussões de dados e pela paciência em ensinar.

Agradeço também ao Bruno Resende, pelo treinamento durante os meses que estivemos juntos, pela ajuda e os ensinamentos.

Agradeço a todos os professores do laboratório, prof<sup>a</sup>. Dr. Glória Regina Franco e prof<sup>a</sup>. Dr Andrea Mara Macedo.

Aos meus amigos do Grupo de Reparo e do LGB, que me ensinaram durante esses anos muito mais coisas do que eu sonhei poder aprender, pelo apoio incondicional, os conselhos, as dicas, os momentos compartilhados.

Agradeço a equipe do NAPG por me permitir fazer parte do grupo, por toda a aprendizagem e oportunidades.

Agradeço a minha família, meus amigos e meu namorado por todo o apoio.

Agradeço também à FAPEMIG pela bolsa, assim como a CNPq e CAPES pelo suporte financeiro e financiamento.

Agradeço a UFMG e ao departamento de Genética, Ecologia e Evolução pela oportunidade de realizar essa pós-graduação e todo o aprendizado adquirido nas disciplinas.

Agradeço a todos os colaboradores desse projeto, que deram todo o apoio e suporte necessário para essa pesquisa.

**“Não vai demorar que passemos adiante  
uma grande e bela ciência, que faz arte em  
defesa da vida” (Chagas, 1928).**

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, que afeta cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo. *T. cruzi* apresenta alta diversidade genética, com linhagens híbridas e não híbridas. Atualmente, esse parasito é classificado em seis unidades de tipagem discreta (DTU): TcI até TcVI. Na literatura há relatos de eventos de troca genética e hibridização em *T. cruzi*, sendo esse um evento importante que pode impactar a diversificação e evolução desse organismo, podendo influenciar em características como patogenicidade e transmissão. Apesar disso, a maneira como a hibridização ocorre ainda não foi totalmente esclarecida. Um fato importante que já foi verificado é que genes envolvidos no processo de recombinação, como RAD51, são mais expressos em células híbridas, e alguns genes envolvidos no processo de meiose estão presentes no genoma de *T. cruzi*, como DMC1 e HAP2. Tendo em vista isso, nós avaliamos a formação de híbridos de *T. cruzi* em sua forma epimastigota, em diferentes DTUs. Mostramos que não somente *T. cruzi* de diferentes DTUs possuem a capacidade de hibridizar, como também conseguimos selecionar por FACS células que são um possível híbrido de duas DTUs diferentes (TcI e TcVI). O DNA desses clones foi extraído e genotipado. Testes de crescimento e resistência à radiação gama também foram realizados, revelando que os clones selecionados possuem características distintas de cada cepa parental. Foi avaliado também se diferentes condições, como meio de cultura com maior nutrição, ou quebra dupla de DNA, podem influenciar no aumento dos eventos de hibridização e foi visto que a nutrição pode estar relacionada com um maior número de aparecimento de células híbridas. O mesmo protocolo de FACS foi realizado para células geneticamente modificadas resistentes a diferentes tipos de antibióticos, independentemente. Clones foram isolados e selecionados em meio contendo ambos os antibióticos, e uma PCR para ambos os marcadores antibióticos foi realizada, mas curiosamente os clones amplificaram apenas um gene de resistência, apesar de sobreviver em meio contendo os dois antibióticos para seleção. Portanto, pode-se sugerir que existe uma via de reprodução sexual em *T. cruzi*, mas que este evento é raro e de complexa regulação.

**Palavras-chave:** fusão citoplasmática; hibridização; troca genética; recombinação; *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease, which affects about 8 million people worldwide. As a species, this parasite presents a high genetic diversity, with hybrid and non-hybrid strains. Currently, this parasite is classified into six discrete typing units (DTU): TcI through TcVI. In the literature, there are reports of genetic exchange and hybridization events between different strains, which can impact the diversification and evolution of this organism, and influence characteristics such as its pathogenicity and transmission. Despite its importance, the mechanisms underlying the hybridization phenomenon has not been fully characterized. Previous studies have shown that genes involved in the recombination process, such as RAD51, are more expressed in hybrid strains. Additionally, genes involved in meiosis, such as DMC1 and HAP2, are present in the *T. cruzi* genome. In this work, we evaluated the formation of hybrids between epimastigotes of different DTUs. Our results revealed that different DTUs have the ability to hybridize. By using FACS, we were able to select possible hybrid clones of the DTUs TcI and TcVI. These clones were genotyped and tested for the ability to grow in culture and to resist gamma radiation exposure. These experiments demonstrated that the selected clones have distinct characteristics from each parental strain. It was also tested whether different culturing conditions (autoclaved versus filtered LIT medium) or the induction of double DNA breakages could increase the frequency of the hybridization events. Among the tested conditions, it was observed that a higher number of hybrid parasites were formed in cultures maintained in filtered medium. This may be related to the higher nutrition quality retained by this sterilizing method. The same FACS protocol was performed to track the hybridization between parasites resistant to two different antibiotics. Hybrid clones could be isolated and selected in the presence of both antibiotics. Once again, parasites were genotyped. However, the PCR results revealed that only one of the antibiotic markers were present. All these results suggest that there is a sexual reproduction pathway in *T. cruzi* but this event is rare and hard to document.

**Key-words:** cytoplasmic fusion; hybridization; genetic exchange; recombination.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais formas de <i>T. cruzi</i> .....	27
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	29
<b>Figura 3:</b> Distribuição de diferentes DTUs pela América latina .....	31
<b>Figura 4:</b> Comparação dos modelos evolutivos das DTUs .....	32
<b>Figura 5:</b> Imagens de microscopia de fluorescência de epimastigotas com dupla marcação (verde e vermelho) .....	46
<b>Figura 6:</b> Taxa de hibridização da cepa CL Brener (TcVI) ao longo do tempo .....	47
<b>Figura 7:</b> Taxa de hibridização da cepa CL Brener (TcVI) quantificado em FACS .....	48
<b>Figura 8:</b> Taxa de hibridização em diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> .....	49
<b>Figura 9:</b> Taxa de hibridização <i>T. cruzi</i> de DTU TcVI (CL Brener) geneticamente modificados .....	50
<b>Figura 10:</b> Taxa de hibridização de <i>T. cruzi</i> de DTU TcI (Dm28c) geneticamente modificados e DTU TcVI (CL Brener) wt .....	51
<b>Figura 11:</b> Taxa de hibridização de Dm28c Duplonocauter de Topoisomerase 3-alfa. ....	52
<b>Figura 12:</b> Taxa de hibridização da mistura de CL Brener com Dm28c .....	53
<b>Figura 13:</b> Curva de crescimento de células de <i>T. cruzi</i> selvagens em meio autoclavado .....	54
<b>Figura 14:</b> Comparação da formação de células fusionadas de CL Brener + Dm28c cultivadas em meio autoclavado ou filtrado.....	55
<b>Figura 15:</b> Taxa de hibridização em misturas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com radiação gama e cultivo em meio filtrado. ....	56

<b>Figura 16:</b> Taxa de hibridização em misturas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com radiação gama e cultivo em meio filtrado com misturas de CL Brener + Dm28c. ....	57
<b>Figura 17:</b> Taxa de hibridização em misturas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com radiação gama e cultivo em meio filtrado com misturas de CL Brener + Dm28c. ....	58
<b>Figura 18:</b> Taxa de hibridização da mistura de Dm28c mais Dm28c. ....	59
<b>Figura 19:</b> Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio .....	60
<b>Figura 20:</b> Curva de crescimento de células de <i>T. cruzi</i> selvagens e clones 19 e 20, irradiadas sob condições normais .....	61
<b>Figura 21:</b> Curva de crescimento de células de <i>T. cruzi</i> selvagens e clones 19 e 20 em condições normais e pós irradiação .....	62
<b>Figura 22:</b> Gel de agarose corado com brometo de etídio .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Primers e programas utilizados na genotipagem dos clones de <i>T. cruzi</i> . .....	42
<b>Tabela 2</b> - Perfil de amplificação dos marcadores utilizados na genotipagem dos subgrupos de <i>T. cruzi</i> . .....	43
<b>Tabela 3</b> - Tabela com o resultado da sobrevivência de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> após 30 dias de cultivo em antibiótico higromicina® .....	64



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µL – Microlitros

**ATM** - Ataxia Telangiectasia Mutated

**BLM** - Bloom syndrome protein

**BRCA1** - Breast Cancer 1

**BRCA2** - Breast Cancer 2

**BSF** - Soro Bovino Fetal

**DMC1** - Recombinase meiótica de DNA 1

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DSB** - Quebra de Fita Dupla no DNA

**DTU** - Unidades Unidades discretas de tipagem “Discreet typing units” de tipagem “Discreet typing units”

**FACS** - Fluorescence activated cell sorter

**GFP** - Proteína verde fluorescente “Green fluorescent protein”

**Gy** - Grey

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana

**HOP1** - Proteína de pareamento homólogo

**HOP2** - Proteína de pareamento homólogo 2

**HPV** - Papilomavírus Humano

**HR** - Recombinação Homóloga

**LIT** - "Liver Infusion Tryptose"

**LLC-MK2** - Células epiteliais renais de macaco Rhesus

**mg** – Miligrama

**mL** – Mililitro

**MRN** - Complexo Mre11-Rad50-Nbs1

**NHEJ** - Junção das Extremidades Não Homólogas

**nm** - Nanômetro

**PBS** - Tampão Fosfato Salino

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**Rad51** - Proteína RAD51 de reparo a DNA

**RFP**– Proteína vermelha fluorescente "Red fluorescent protein"

**RNA** - Ácido Ribonucléico

**RPA** - Proteína de Replicação A

**SFB** – Soro fetal bovino

**VSG** - Glicoproteína de superfície variante

**XRCC4** - X-Ray Repair Cross Complementing 4

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Eucariotos e a origem e função do sexo .....	19
1.2 Ordem Kinetoplastida.....	22
1.3 Doença de Chagas e o Trypanosoma cruzi.....	23
1.4 Variabilidade genética em Trypanosoma cruzi .....	29
1.5 Evidências de hibridização em tripanossomatídeos .....	32
1.6 Recombinação .....	34
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 Objetivos Gerais.....	38
3.2 Objetivos Específicos .....	38
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
4.1 Cultivo dos parasitos .....	39
4.2 Ensaio de Fusão citoplasmática utilizando Cell Trace TM Assay .....	39
4.3 Montagem e análise das lâminas – CellTrace.....	40
4.4 FACs e seleção de híbridos .....	40
4.5 Extração de DNA Genômico .....	41
4.6 Genotipagem por PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida .....	41
4.7 Curva de crescimento .....	43
4.8 Curvas de crescimento pós tratamento com radiação gama .....	44
4.9 Estatística .....	44
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1 A fusão citoplasmática não é um evento constante em T. cruzi .....	45
5.2 CL Brener aparenta maior aptidão para a formação de células fusionadas .....	48
5.3 Os genes envolvidos na recombinação influenciam na fusão citoplasmática .....	49
5.4 A nutrição pode estar envolvida com a capacidade de T. cruzi formar híbridos .....	52
5.5 O tratamento com radiação gama não induziu significativamente o número de células fusionada .....	55
5.6 É possível selecionar e cultivar células duplo marcadas com o FACS .....	58
5.7 PCR de genotipagem dos clones isolados da mistura de CL Brener e Dm28c .....	59
5.8 O crescimento dos clones é semelhante ao de Dm28c, quando em condições normais ....	60
5.9 O crescimento dos clones é semelhante ao de CL Brener, quando irradiados com radiação gama .....	61
5.10 Células de Dm28c selvagens são viáveis em meio de cultivo contendo higromicina® ..	62
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>75</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Eucariotos e a origem e função do sexo

Na biologia a vida celular é agrupada em três grandes domínios, Bacteria, Archaea e Eukarya. Os domínios Bacteria e Archaea englobam os organismos procariontes, que são unicelulares, anucleados e assexuados, e Eukarya inclui uma grande gama de organismos uni e pluricelulares, como as plantas, fungos, animais e protozoários, todos organismos que possuem núcleo para guardar seu DNA, além de outras características, como organelas membranosas. Muitos eucariotos se reproduzem de maneira sexual, mas alguns ainda mantêm o estilo reprodutivo assexuado. E, curiosamente, muitos organismos procariontes assexuados apresentam genes de meiose, como no caso de algumas espécies de Archaea, onde já foram identificados genes homólogos a fusexinas, uma superfamília de proteínas relacionadas a fusão de gametas e células somáticas (Woese; Kandler; Wheelis, 1990; Cavalier-Smith, 1998; Engelstädter, 2017; Moi, *et al.*, 2022).

O surgimento e evolução dos eucariotos é um assunto bastante debatido. Um fato curioso é que a evolução desse grupo não ocorreu totalmente de maneira darwiniana, onde é esperado o surgimento - através de mutações - de genes benéficos que se espalham através do sucesso reprodutivo diferencial. Pelo contrário, a história dos eucariotos envolve especialmente um fluxo gênico horizontal e de organismos distintos se fundindo em organismos inteiramente novos (ADL *et al.*, 2012; Gray, 2017).

A maior parte dos estudos vêm demonstrando que o eucarioto mais antigo teria surgido próximo da primeira glaciação global, há cerca de 2,3 bilhões de anos, o que é corroborado por estudos filogenéticos. Em 2017, achados fósseis de algas também apoiam esses dados, pois os exemplares encontrados datam de 1,6 bilhões de anos. Há também registros de organismos unicelulares semelhantes a algas que são datados de 2,2 bilhões de anos (B.DeRennaux, 2008; Bengtson, Stefan, *et al.*, 2017).

Uma das explicações para o surgimento dos eucariotos é o aumento do oxigênio, resultado do aumento no número de procariontes fotossintetizantes. Essa dinâmica teria causado um resfriamento global e também levado à morte várias populações de procariontes anaeróbios. A partir desse momento há duas hipóteses: alguns grupos acreditam que os eucariotos já existiam, porém em uma baixa abundância antes do aumento do oxigênio,

enquanto outros acreditam que eles se originaram logo após este evento. Apesar da pequena discordância, é consenso para a maioria que o aumento dos níveis de oxigênio é o provável responsável pela maior abundância e aumento da multicelularidade (Blair, *et al.*, 2001; Hessen, 2008).

Um outro evento importante, e que talvez tenha mudado a história evolutiva dos eucariotos, é o surgimento da reprodução sexuada. Surgida a cerca de 1,2 bilhões de anos, o novo tipo de reprodução trouxe consigo uma série de desvantagens que não existiam no modo reprodutivo assexuado. O mais intrigante, no entanto, é que apesar dessas desvantagens, como uma menor taxa de crescimento populacional, transmissão de doenças infecciosas (como HIV e HPV) e infestações por inúmeros parasitos - quando há cópula e outros contatos físicos entre os seres vivos -, e o favorecimento da expressão de genes recessivos deletérios, ainda assim uma grande gama de organismos se reproduzem sexuadamente (Nicholas, 2000; B.DeRennaux, 2008; Bernstein *et al.*, 2010).

Porém, não somente desvantagens vieram acompanhando a reprodução sexuada. Até a década de 50, acreditava-se que as principais implicações do sexo era conferir vantagem às espécies diante de alterações ambientais e frente a predadores, parasitos e microorganismos causadores de doenças (hipótese da variabilidade). Porém, com as contribuições da Biologia Molecular um novo horizonte pode ser vislumbrado pela academia, modificando definitivamente a visão dos cientistas sobre o assunto. Os estudos biomoleculares levaram a hipótese de que o sexo é, primordialmente, uma adaptação que permite a correção de mutações deletérias (hipótese do reparo) (Bernstein, Gregory e Michod, 1981).

E apesar de a variabilidade ser realmente uma vantagem quando se fala de reprodução sexuada, vários estudos demonstraram que a curto prazo nem sempre é possível observar os benefícios dessa variação. E é importante lembrar que a seleção natural não atua com previdência, o que faz com que a hipótese da variabilidade sozinha não seja o suficiente para fixar a reprodução sexuada em tantas populações. Visto isso, foi proposto que um grande benefício a curto prazo advindo da reprodução sexual seria o reparo do DNA por recombinação das linhagens germinativas. Deve-se lembrar que os níveis de oxigênio na atmosfera terrestre chegaram a cerca de 21% (atual concentração) há 500 milhões, possivelmente ocasionando danos no DNA gerados por estresse oxidativo. Esse cenário teria sido o responsável por direcionar às células à evolução meiótica, selecionando mecanismos eficientes de reparo de DNA (Bernstein e Johns, 1989; Bernstein, Bernstein e Michod, 2017; Hörandl; speijer, 2018).

De fato, um dos eventos principais da reprodução sexual é a recombinação genética que pode ocorrer entre indivíduos da mesma espécie, de espécies aparentadas propiciando geração de híbridos férteis, ou ainda entre espécies completamente diferentes, como por exemplo o que acontece entre os genes de vírus com genes bacterianos, resultando em gerações de bactérias com o conteúdo genético diferente do que outrora foram. Se este processo pode ser caracterizado como sexo ou não ainda é debatido, mas alguns grupos acreditam que no mínimo isso possa apontar o sexo como um evento primordial, uma vez que ao incorporar os genes dos vírus as bactérias adquirem uma maior variabilidade genética que pode contribuir no *pool* genético da população, podendo produzir linhagens mais resistentes a novas infecções (Michod e Levin, 1988).

Por isso, é muito discutido se a conjugação seria uma forma de sexo rudimentar que ocorre entre as bactérias. Nesse evento, ocorre a transferência de plasmídeo entre uma célula doadora e uma receptora. As doadoras de DNA são consideradas bactérias do tipo masculino, enquanto que as receptoras seriam as bactérias do tipo feminino. Porém, ao final da conjugação não ocorre o aumento no número de células bacterianas, o que impossibilita que esse processo seja considerado um evento típico de reprodução sexuada (Michod e Levin, 1988).

Atualmente, já foram identificadas diversas espécies de eucariotos microbianos que apresentam uma variedade de processos que podem ser considerados sexuais. Em todos esses processos, porém, foi observado um elemento central, a singamia e a meiose. Singamia é a fusão de duas células ou dois núcleos, e estudos recentes vêm demonstrando que espécies eucarióticas unicelulares como *Trypanosoma brucei*, *Leishmania sp* e *Trypanosoma cruzi* possuem a capacidade de fundir suas células e até mesmo seu DNA, o que indica uma possível via sexual na reprodução desses organismos (Butterfield, 2000; Gibson *et al.*, 2018 ; Silva e Machado, 2022).

Já na meiose, em geral a célula replica seu DNA de forma que cada cromossomo homólogo terá duas cromátides irmãs idênticas. Logo após, os cromossomos homólogos se pareiam e pode ocorrer o crossing-over, também conhecido como recombinação homóloga, onde um ponto dos cromossomos homólogos é quebrado e recombinado. O crossing-over é sucedido por dois ciclos de divisão celular que irão produzir quatro células filhas haploides contendo metade do conteúdo genômico da célula mãe. Um fato interessante é que alguns estudos vêm demonstrando que organismos que, anteriormente, eram conhecidos por ter uma reprodução estritamente clonal, como *T. brucei*, aparentemente possuem a capacidade de passar

pelo processo de meiose, o que é mais um indicativo de reprodução sexual nesses organismos (Bernstein e Bernstein, 2019; Gibson *et al.*, 2021).

## 1.2 Ordem Kinetoplastida

Os cinetoplastídeos são organismos da vasta ordem Kinetoplastida que incluem organismos de vida livre e também parasitários. Pertencentes também ao filo Euglenozoa, esses organismos apresentam genomas nucleares e possuem uma única mitocôndria incomum e modificada que contém o cinetoplasto, presente em todos os cinetoplastídeos (e que dá nome ao grupo) (Stoeck, *et al.*, 2005; Lukeš, *et al.*, 2018; Kostygov, *et al.*, 2021).

Mesmo na atualidade, a origem e a história evolutiva dos cinetoplastídeos é bastante discutida, devido à falta de registros mais esclarecedores sobre o grupo. Taxonomicamente, a ordem Kinetoplastida é agrupada em dois grandes grupos, Bodonina e Trypanosomatina. Os Bodonina representam uma gama de organismos de vida livre com importante função ecológica em ambientes aquáticos, seja marinho ou dulcícola. Já o grupo Trypanosomatina representa os organismos parasitários, como *Trypanosoma cruzi*, entre outros. Com os adventos da biologia molecular, porém, esse grupo foi subdividido em duas classes ligeiramente diferentes: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina - sendo a última o subgrupo dos Trypanosomatidae -, bem como três subordens recentemente criadas de bodonídeos predominantemente de vida livre, Eubodonina, Parabodonina e Neobodonina. Um fato interessante é que estudos filogenéticos têm demonstrado que uma das linhagens dos bodonídeos é irmã dos parasitos tripanossomatídeos, o que levanta o questionamento de como o parasitismo se originou dentro do grupo (Kivic e Walne, 1984).

*Trypanosoma cruzi* pertence à classe Kinetoplastida, onde são encontrados espécies que fazem parte do grupo cinetoplastídeos, compostos de organismos flagelados de vida livre e parasitos de animais, insetos e plantas. Uma família pertencente a essa ordem é a Trypanosomatidae que possui diversas espécies de importância médica, como os parasitos do gênero *Leishmania*, que são responsáveis pelas leishmanioses, o *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono na África, e o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas no continente americano. Os representantes desta ordem apresentam ciclos biológicos complexos, possuindo ciclo de vida heteroxeno e uma regulação precisa da expressão gênica que possibilita

as mudanças morfológicas e metabólicas essenciais para a sobrevivência desses organismos em seus hospedeiros mamíferos e insetos vetores (Kramer, 2012; Lukeš *et al.*, 2014).

Uma característica que se destaca nos tripanosomatídeos e faz deles únicos entre os eucariotos é a presença do cinetoplasto. O cinetoplasto é encontrado dentro da única mitocôndria que esses organismos possuem, e é formado por uma rede de DNA circular (minicírculos e maxicírculos) conectados entre si. No cinetoplasto está presente cerca de 25% do DNA desses parasitos e possui funções relacionadas à mitocôndria. O maxicírculo codifica proteínas mitocondriais e os minicírculos heterogêneos codificam RNAs guias que são utilizados para a edição de RNAs mitocondriais (Read; Lukeš; Hashimi, 2016).

### **1.3 Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi***

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, é uma das 20 doenças tropicais negligenciadas que atingem mais de um bilhão de pessoas no mundo. Todo ano, cerca de 8 milhões de pessoas são acometidas pela doença, que é causada por *Trypanosoma cruzi*, um protozoário intracelular. A doença afeta principalmente populações rurais e pobres - onde pessoas se encontram vulneráveis e em moradias inadequadas, com baixas condições de saneamento básico, trazendo consequências críticas tanto para a saúde pública quanto para as economias nacionais. Em 2010, apenas no Brasil, estimava-se que cerca de 1,2 milhões de pessoas eram portadoras da doença. Atualmente a tripanossomíase americana também é encontrada em países não endêmicos no pacífico oeste, Europa e América do Norte, devido a eventos de imigração. (Zingales, *et al.*, 2012; *Centers for Disease and Control Prevention*, 2017).

A primeira descrição da doença de Chagas foi realizada por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, um epidemiologista brasileiro, no ano de 1909. Chagas descobriu não apenas o agente causador da doença, mas toda etiologia, seus vetores, alguns dos animais reservatórios da doença e o ciclo de vida do protozoário. Devido a suas descobertas, Chagas foi indicado para o Nobel não uma, mas quatro vezes (Chagas, 1909; Pittella, 2009).



Foi em 1907 que Carlos Chagas viajou para a cidade onde ele faria a descoberta que mudaria totalmente sua trajetória profissional, gravando seu nome na história da ciência como um dos maiores pesquisadores de sua época.

“O descobrimento desta moléstia constitui o mais belo exemplo do poder da lógica a serviço da ciência. Nunca até agora, nos domínios das pesquisas biológicas, se tinha feito um descobrimento tão complexo e brilhante e, o que mais, por um só pesquisador,” Oswaldo Cruz.

Chagas foi enviado a Lassance, uma belíssima cidade ao norte de Minas dotada de encantadoras cascatas e cachoeiras, mas que passava por uma intensa crise de malária. Além de afetar severamente a população, a doença estava prejudicando as obras de prolongamento da Estrada de Ferro Central do Brasil, afetando o projeto que tinha a intenção de unir o norte ao sul do país com a expansão da ferrovia do Rio de Janeiro até Belém do Pará. Chegando a pequena cidade de Lassance, Chagas inicia seu trabalho, realizando a profilaxia da malária, porém, no decorrer do ano seguinte seu trabalho ganha uma nova perspectiva ao identificar uma nova doença nos moradores. Conjuntamente a isso, Chagas utilizava seus horários vagos para estudar, e em uma de suas folgas descobriu uma nova espécie de protozoário, que nomeou de *Trypanosoma minasense*. Em paralelo, Chagas também ficou curioso com um inseto que vinha se proliferando nas frestas das casas de pau-a-pique, o barbeiro do gênero *triatoma* (Chagas, 1908).

Ao direcionar o foco de seus estudos para o barbeiro, Chagas identificou no intestino do inseto um protozoário que se assemelhava bastante ao protozoário que ele havia encontrado em saguis que ele estava estudado, concluindo que possivelmente o que ele via era uma forma evolutiva diferente do *Trypanosoma minasense*. Curioso, Chagas decide enviar os insetos para Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, com o pedido de que ele alimentasse saguis saudáveis com os barbeiros. Os saguis em questão adoeceram, e Chagas foi chamado por Oswaldo Cruz de volta para o Rio, onde com a ajuda de outros pesquisadores desvendou o ciclo de vida do novo parasito, renomeado-o então de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz, por quem ele tinha grande estima (Chagas, 1909).

Chagas, então, volta para Lassance, em 1909, colocando em prática uma série de investigações hematológicas em pacientes enfermos e também em animais de estimação. Após realizar vários exames, ele identificou em um gato doméstico, que residia em um lar sob

infestação de barbeiros, a presença do *T. cruzi*, indicando pela primeira vez o ciclo doméstico do parasito. Mais tarde, foi identificado também a presença de *T. cruzi* em uma criança, Berenice, que na época tinha 2 anos e foi acompanhada até a velhice. Em 1912, Chagas encontrou em tatus a presença do parasito, o que demonstrava o ciclo silvestre de *T. cruzi* e fechava as descrições dos diferentes ciclos de transmissão do parasito (Chagas, 1909).

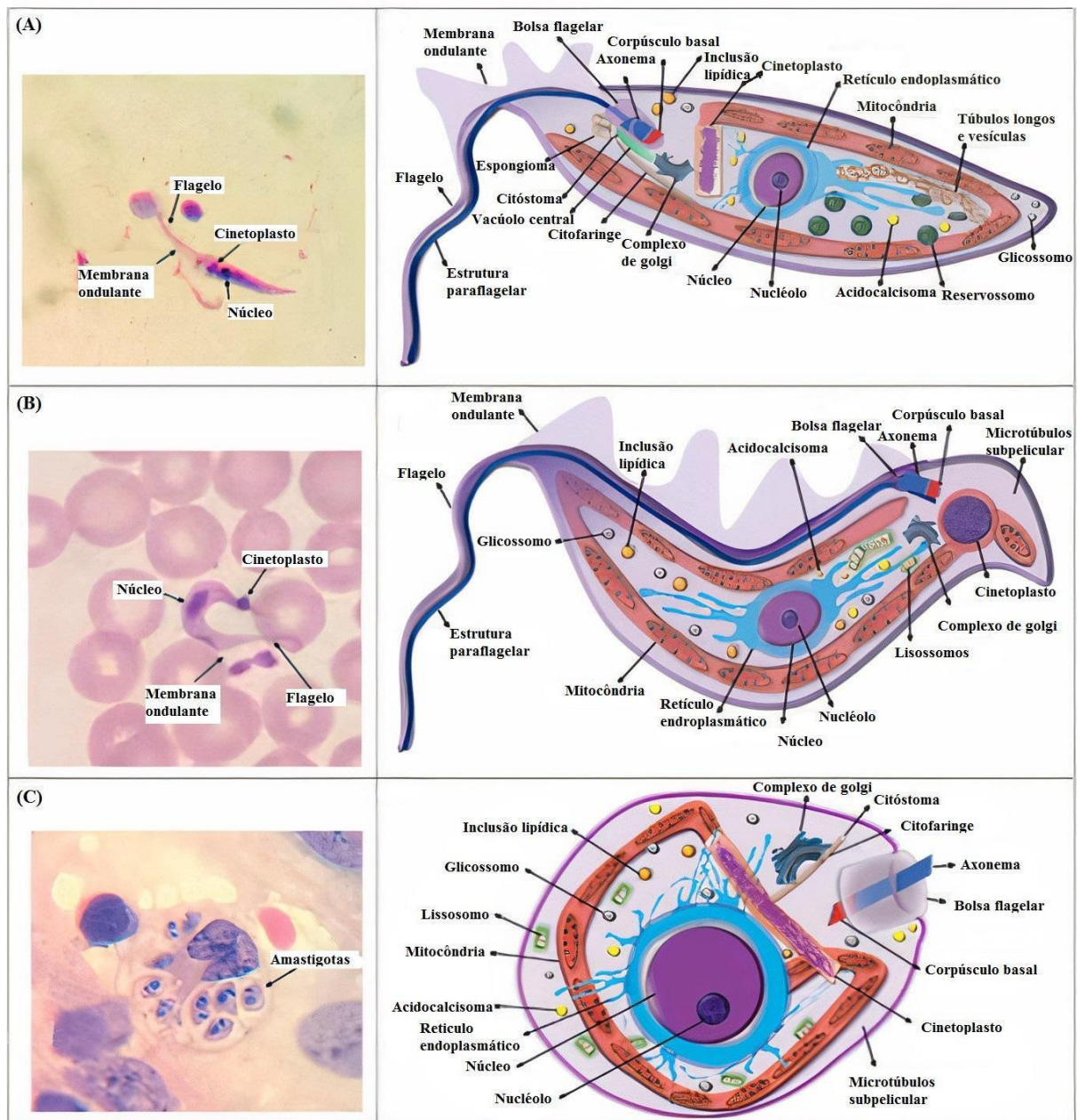
Os vetores que participam do ciclo de vida de *T. cruzi* são os insetos hematófagos da ordem Hemiptera, representados pelas espécies *Triatoma barberi*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*. A infecção de pessoas pelo *T. cruzi* em áreas endêmicas da doença se dá principalmente pela via vetorial, quando acontece o contato do local da picada, lesões já existentes na pele, ou mesmo mucosas íntegras dos olhos e boca, com as fezes do barbeiro contaminado, durante o repasto sanguíneo. Porém, esta não é a única forma de transmissão da doença, sendo a transmissão oral uma via importante de infecções. Essa forma de infecção acontece quando pessoas ingerem alimentos contaminados com fezes do barbeiro, ou o próprio inseto contaminado. Outras vias de infecção são a congênita, transmitida de mãe para filho na gestação ou parto, transfusões de sangue ou transplante de órgãos advindos de doadores infectados e por acidentes de laboratório (Schaub, 2021).

A doença de Chagas se desenvolve em duas fases, a aguda e a crônica. A fase aguda tem início após a incubação do parasito, em um período de uma a duas semanas, no caso da via vetorial de infecção. Essa fase pode se estender até 8 semanas, sendo caracterizada principalmente pela alta parasitemia. Apesar disso, a maioria das infecções em fase aguda apresenta a forma clínica assintomática ou com apenas sintomas leves e pouco específicos, como febre prolongada, cefaléia, linfadenopatia, dor muscular, entre outros. Uma pequena parcela dos infectados pode apresentar nódulos na pele ou o sinal de Romaña, que é composto por edema de pálpebra, indicando o local de entrada do parasito no organismo. Durante a fase crônica da doença, os parasitos são encontrados principalmente nos músculos cardíacos e digestivos. A fase crônica da doença de Chagas costuma ser assintomática e as pessoas podem permanecer durante toda a vida sem a progressão da doença para quadros sintomáticos, porém cerca de 20 a 30% das pessoas podem apresentar quadros sintomáticos que podem perdurar de anos a décadas. As principais complicações da fase crônica são o desenvolvimento de megacólon e megaesôfago (no caso dos parasitos com tropismos por tecido digestivo) e cardiomiopatias (no caso dos casos cardiovasculares). Um fato importante é que os pacientes podem apresentar apenas sintomas cardíacos, gastrointestinais ou ambos os sintomas ao mesmo

tempo. O tratamento da doença deve ser feito preferencialmente na fase aguda, já que durante a fase crônica os fármacos utilizados, benzonidazol e nifurtimox, apresentam baixa eficácia (Bern, 2015; Pérezmolina, Molina, *et al.*, 2018; Who, 2021).

É importante também ressaltar, que ambos os fármacos possuem elevada incidência de efeitos colaterais, levando ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes. Em alguns casos a toxicidade de tais fármacos chega ao ponto de gerar a descontinuidade da terapia (COURA; CASTRO, 2002; JACKSON *et al.*, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, sendo ele um organismo heteroxeno. Isso significa que ele apresenta dois hospedeiros, o invertebrado (intermediário) descrito anteriormente e o hospedeiro mamífero (definitivo), entre eles os humanos. Outra característica importante deste protozoário é que durante seu ciclo de vida ele apresenta formas distintas, sendo as principais epimastigota amastigota, tripomastigota metacíclica e tripomastigota sanguínea (Figura 1). Epimastigota é a forma replicativa não infectante encontrada no intestino médio do hospedeiro invertebrado (barbeiro) e possui um formato alongado e com flagelo visível. Outra forma não infectante e que também é replicativa é a amastigota, de morfologia redonda, sem flagelo visível e que é encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado. As formas infectantes, tripomastigotas, possuem flagelos evidentes e uma membrana ondulante. Eles não são capazes de se dividir e são encontradas tanto no hospedeiro invertebrado quanto vertebrado, sendo o tripomastigota metacíclico a forma infectante encontrada na porção final do intestino do inseto e a forma tripomastigota sanguínea, encontrada nos mamíferos (Bern, 2015; Sandri, *et al.*, 2022).

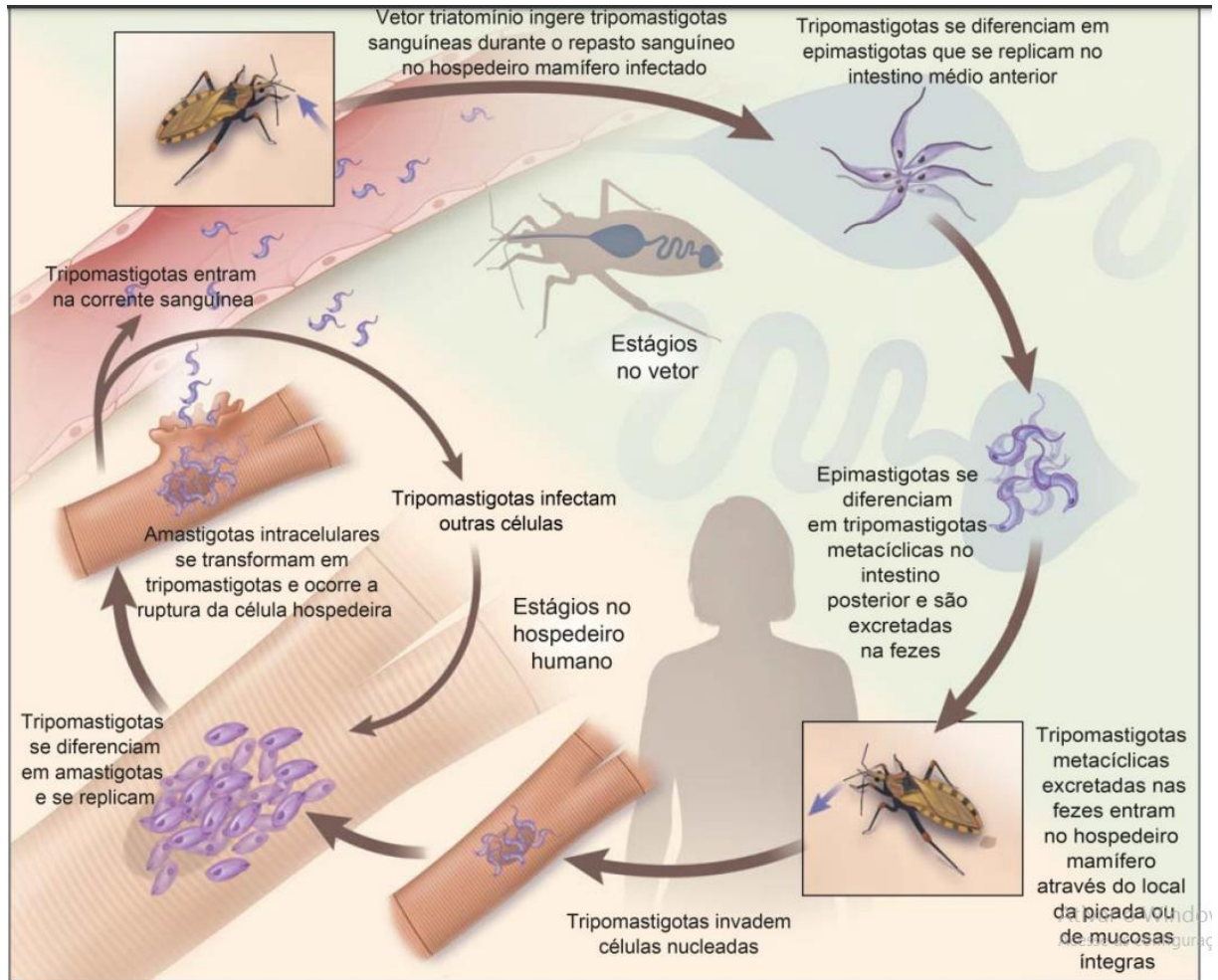


**Figura 1: Principais formas do *T. cruzi*.** a) Epimastigota: forma replicativa encontrada no tubo digestivo do vetor (triatomíneos). b) Tripomastigota: forma não replicativa encontrada nas fezes e urina do inseto vetor e também no sangue de mamíferos infectados. c) Amastigota: forma replicativa encontrada dentro da célula do hospedeiro definitivo (mamífero).

Figura adaptada de: Sandri, *et al.*, 2022

Como mencionado anteriormente, o ciclo de vida do parasito é heteroxeno (Figura 2) e se completa após passar pelos dois hospedeiros. Esse ciclo tem início quando o triatomíneo, por meio do repasto sanguíneo, ingere formas tripomastigotas sanguíneas de mamíferos infectados. Ao chegar no intestino médio do barbeiro, os tripomastigotas passam por um processo de

diferenciação, tornando-se a forma replicativa epimastigota que ao atingirem o intestino posterior se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos - capazes de infectar mamíferos - através do processo de metaciclogênese. Em um novo repasto sanguíneo as formas infectantes do parasito são liberadas junto com as fezes do triatomíneo e podem infectar o mamífero. Uma vez dentro da corrente sanguínea do hospedeiro definitivo, os tripomastigotas metacíclicos penetram os fagócitos (células imunológicas que fazem a ingestão de partículas estranhas entram no organismo) mediante o recrutamento de lisossomos, fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira e formação de vacúolos parasitóforos que mantêm o *T. cruzi* dentro do citoplasma celular. Já no citoplasma, o vacúolo parasitóforo é rompido, o que é de suma importância para a conversão do parasito em sua forma replicativa amastigota, estabelecendo assim a infecção. Dentro da célula as amastigotas podem, ocasionalmente, converter-se em tripomastigotas novamente, rompendo a célula e caindo novamente na corrente sanguínea, o que acarreta em uma infecção generalizada de todos os tecidos do organismo e, com frequência, os tecidos mais atingidos são o tecido cardíaco e tecidos do sistema digestivo (Bern, 2015; Kramer, 2012).



**Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Esquema mostrando as várias formas do parasito nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro deposita as fezes na pele do homem que se infecta com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após invadir as células, se diferenciam em amastigotas e se multiplicam. Em seguida, se diferenciam em tripomastigotas, caindo na corrente sanguínea, onde podem ser transmitidos novamente para o barbeiro por meio do repasto sanguíneo. No triatomíneo, o *T. cruzi* se transforma em formas epimastigotas e se multiplica, transformando-se em seguida em tripomastigotas. Figura adaptada de Bern, 2015.

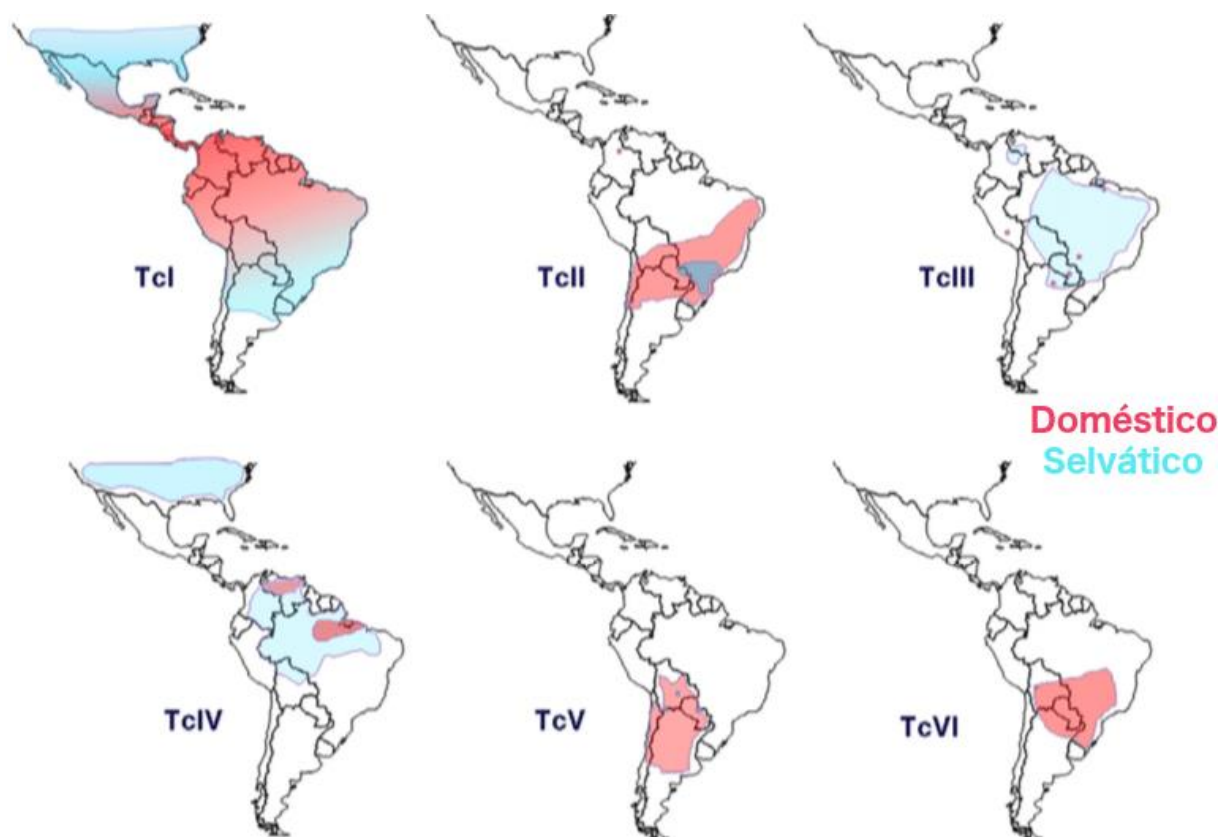
#### 1.4 Variabilidade genética em *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* apresenta grande diversidade genética, com várias linhagens que diferem na capacidade de infectar, tropismo de tecido, plasticidade genômica, resistência ao estresse, susceptibilidade a fármacos, dentre outras características. Sabendo então que *T. cruzi* possui

diversas linhagens, a classificação dessas foi de grande interesse, sendo realizada através de marcadores moleculares e imunológicos. Em 2009, na reunião de celebração do centenário da descoberta da Doença de Chagas, foi proposto, por um grupo de pesquisadores, que as linhagens de *T. cruzi* fossem novamente classificadas. Então, *T. cruzi* foi dividido em seis grupos, TcI – TcVI, e esses grupos foram chamados de DTU (*Discrete Typing Unit*), que representa um conjunto de isolados que podem ser identificados por marcadores moleculares e imunológicos comuns, por serem geneticamente semelhantes. Atualmente, um sétimo DTU, denominado Tcbat, foi observado em morcegos (Zingales, *et al.*, 2009; Cominetti *et al.* 2014).

As DTUs diferem-se significativamente em sua distribuição geográfica e nicho ecológico. Dentre as sete DTUs identificadas, TcI é apontado como o mais abrangente das Américas (Figura 3), sendo altamente distribuída. Tal DTU pode ser encontrada em triatomíneos tanto de vida silvestre quanto doméstica. O TcII, além de ter baixa diversidade genética, se distribui predominantemente nas regiões centro-sul dos países da América do Sul e tem sido relacionado ao ciclo de transmissão doméstico. O TcIII também está difundido pela América do Sul e ainda é discutido se ele é, ou não, uma linhagem híbrida que, em tese, teria se originado de diferentes eventos de trocas genéticas. Semelhantemente ao TcIII, o TcIV está disseminado na região da América do Sul, com exceção do Gran Chaco, onde permanece ausente. Enquanto o TcIII ocorre com baixa frequência em humanos, TcIV ocorre frequentemente. As DTUs TcV e TcVI são híbridas encontradas na região sul e central da América do Sul. (Zingales *et al.* 1998, Zingales *et al.* 2012; Zingales, 2011; Lima *et al.* 2014; Ramírez, Montilla, Flórez e Cucunubá, 2014).





**Figura 3: Distribuição de diferentes DTUs pela América latina.** Mapa da América latina com detalhes em cores para a distribuição das diferentes DTUs espalhadas pelo território. Em vermelho a distribuição doméstica e em azul a distribuição selvática. Adaptado de Zingales, 2012.

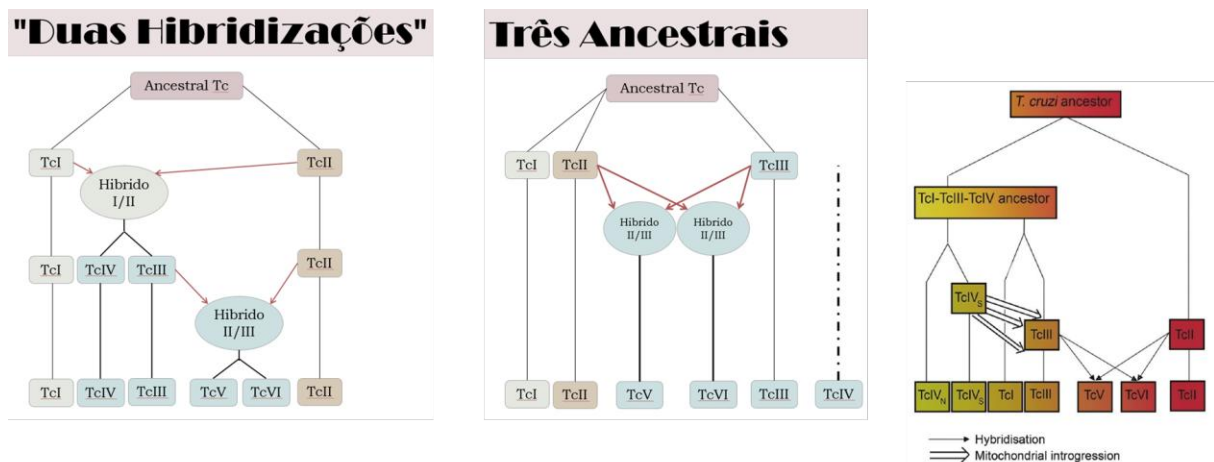
Atualmente, três modelos foram sugeridos para explicar a evolução das DTUs na natureza (Figura 3), o modelo das *Duas Hibridizações*, o modelo dos *Três Ancestrais* e, um mais recente, proposto por Tomasini e Diosque (2015). Estudos demonstraram uma expressiva heteroziguidade em TcV e TcVI, indicando que essas DTUs são híbridas derivadas de TcII e TcIII. Por isso, os modelos recentes de evolução das DTUs integraram eventos de hibridização, com o intuito de explicar a existência de DTUs híbridas (Sturm *et al.*, 2003; Westenberger *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; Sturm e Campbell, 2010).

Nos três modelos propostos há dois eventos de hibridização, sendo que no modelo de Duas Hibridizações temos um ancestral comum dando origem à TcI e TcII, que ao hibridizar deram origem ao TcIII e TcIV em um evento antigo de troca genética com perda da heteroziguidade entre a progênie, gerando híbridos homozigotos. Um segundo evento mais recente de hibridização entre TcII e TcIII teria originado os híbridos heterozigotos TcV e TcVI. Já o modelo de Três Ancestrais, TcI, TcII e TcIII derivam de um mesmo ancestral comum e



dois eventos recentes de troca genética entre TcII e TcIII originariam TcV e TcVI. Nesta hipótese fica em aberto a origem da TcIV.

No modelo proposto por Tomasini e Diosque (2015), um ancestral comum teria se diversificado há, aproximadamente, três milhões de anos em dois grupos distintos, TcII e TcI, TcIII e TcIV. A primeira DTU, ao se separar do clado, teria sido a TcIV, divergindo em dois grupos geograficamente distintos TcIVS (do Sul) e TcIVN (do Norte). Após se divergir, TcIVS teria transferido o cinetoplasto para TcIII em vários mecanismos de introgressão mitocondrial que permanecem desconhecidos. Depois, eventos recentes de hibridização independentes teriam ocorrido entre TcII e TcIII, dando origem aos DTUs TcV e TcVI.



**Figura 4: Comparação dos modelos evolutivos das DTUs.** Adaptado de Zingales, *et al.*, 2012 e Tomasini e Diosque, 2015.

### 1.5 Evidências de hibridização em tripanossomatídeos

O fenômeno de hibridização pode ser definido como um evento de trocas genéticas que ocorre entre dois organismos vivos aumentando a variabilidade genética. Sendo assim, a hibridização é um mecanismo sexual evolutivo que irá favorecer a conservação de variações no genoma, podendo, ou não, conferir ao organismo híbrido um maior sucesso evolutivo. Isso é particularmente importante ao se tratar de patógenos microcelulares, pois novas combinações de características, como resistência a drogas ou virulência, podem ser geradas, potencialmente

levando a cepas mais patogênicas e surtos de doenças (Morales e Dujon, 2012; Kay, *et al.*, 2022).

Atualmente vários estudos vêm demonstrando a ocorrência e importância dos eventos de hibridização em tripanossomatídeos, havendo estudos recentes em *Trypanosoma brucei*, *Leishmania sp*, e também em *Trypanosoma cruzi*. Porém, o primeiro a fornecer evidências de reprodução sexual para o grupo foi o *T. brucei*, em um estudo onde o hospedeiro invertebrado foi infectado com parasitos contendo diferentes marcadores genéticos. Após a passagem e seleção clonal foram isolados populações de parasitos heterozigotas para os marcadores genéticos utilizados (Kay, *et al.*, 2022; Louradour, *et al.*, 2021; Alves, *et al.*, 2018; Jenni *et al.*, 1986).

Como abordado anteriormente, *T. cruzi* apresenta grande variabilidade intraespecífica, contendo duas DTUs naturalmente híbridas (TcV e TcVI), o que demonstra a capacidade desse organismo de manter a viabilidade celular após a junção de duas cepas distintas. Em laboratório, o primeiro registro da ocorrência de híbridos foi em 2003, em um experimento utilizando duas populações de *T. cruzi* TcI que foram separadamente marcadas com genes de resistência a antibiótico e misturados durante infecção de células LLC-MK2, uma linhagem de célula epitelial de rim de macaco. Após liberação dos parasitos, clones contendo ambos marcadores foram selecionados em meio de cultura contendo ambos antibióticos. Os híbridos foram confirmados por PCR (Gaunt *et al.*, 2003; Franzén *et al.*, 2011; Zingales *et al.*, 2012).

Depois deste, vários estudos observaram eventos que levam a crer que existe uma forma de reprodução sexual em *T. cruzi*, porém ainda não se sabe como esse processo é regulado e qual a sua influência na história evolutiva desta espécie. Dois estudos realizados em 2018 e 2019, por Alves e colaboradores e Repolês, respectivamente, demonstraram a capacidade que *T. cruzi* possui em recombinar DNA. O experimento foi realizado com diferentes análogos de timidina (5'-cloro-2'-deoxiuridina (CldU) e 5'-iodo-2'-deoxiuridina (IdU)), tratando duas populações isoladas de *T. cruzi* e depois as misturando e incubando por 24 horas. Os pesquisadores observaram, por meio de microscopia de fluorescência, a ocorrência de células contendo ambos os análogos, indicando que houve a formação de células híbridas. Em um outro experimento utilizando marcadores de resistência a antibiótico foi possível isolar clones contendo ambos os genes de resistência, o que é mais um demonstrativo da capacidade desses organismos hibridizar, o que reforça a importância dos estudos nessa área (Baptista *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2018; Schwabl *et al.*, 2019; Repolês, 2019).

Outro dado interessante foi obtido por Louradour e colaboradores (2022), em um estudo realizado com *Leishmania sp* irradiadas com 6 Gy de radiação gama. O estudo mostrou que após o tratamento com radiação os níveis de hibridização aumentaram, mostrando uma possível envolvimento entre o evento de hibridização e reparo de DNA.

## 1.6 Recombinação

O simples fato de estarmos vivos implica em dano de DNA, devido a agentes exógenos, como radiação, e também processos endógenos da própria célula, como o metabolismo celular e a replicação. Devido a este cenário, evolutivamente, foram selecionados mecanismos celulares responsáveis pela preservação da integridade do genoma e restauração das propriedades, tanto estruturais quanto funcionais, do DNA, após um dano. Dentre os vários tipos de dano que o DNA pode sofrer, as quebras de fita dupla (DSBs, do inglês *double-stranded breaks*) representam uma das lesões mais críticas porque podem levar à morte celular, no caso de não serem reparados, ou ocasionar deleções, translocações e fusões no DNA (rearranjos genômicos) (Li e Wolf-Dietrich, 2008; Zhao *et al.*, 2020; Elbakry e Markus, 2021).

No caso dos DSBs, as células contam com algumas vias de reparo, sendo as principais a junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) e a recombinação homóloga (HR do inglês *Homologous Recombination*). Enquanto o NHEJ implica na ligação das extremidades quebradas, não sendo uma via de grande fidelidade, o HR utiliza uma sequência íntegra de DNA com molde para o reparo, o que o torna uma via de alta fidelidade. Não somente isso, a HR também atua na duplicação fiel do genoma, concedendo meios de tolerar o estresse replicativo. Um fato interessante, é que em *T. cruzi* há uma ausência de genes envolvidos com NHEJ, como DNA ligase IV e XRCC4, que codificam importantes proteínas envolvidas nessa via de reparo o que indica a incapacidade desse parasito de realizar essa via de reparo. Porém, como na maioria dos eucariotos, estudos demonstraram que os tripanossomatídeos são capazes de realizar o reparo pela via de HR (Lieber *et al.*, 2003; Yeeles and Dillingham, 2010; Glover *et al.*, 2011; Bajinskis *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015).

O reparo por HR é bastante complexo e conta com a participação de diversas proteínas, algumas delas altamente conservadas em eucariotos, como o grupo epistático de RAD52. O primeiro passo para que ocorra a HR é a sinalização das DSBs, que irá ocorrer via ativação da

cinase Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM, do, inglês *Ataxia teleangiectasia mutated*) que é recrutada até o local de dano por meio de interação com o complexo proteico MRN (MRE11 - RAD50- NBS1). Uma vez recrutadas, essas proteínas desencadeiam a fosforilação de diversos substratos, o que dará início à cascata de sinalização que ativará checkpoints do ciclo celular, incitando o recrutamento de proteínas efetoras do reparo (Bosch, Bree, Lowndes, 2003).

Um desses substratos que sofre fosforilação é a histona  $\gamma$ H2Ax, que é ubiquitinada para a ligação das proteínas BRCA1 e 53BP1, posterior recrutamento de proteínas de replicação A (RPA, do inglês *Replication protein A*) e Rad51 (principal recombinase da HR) que se une ao DNA fita simples formando nucleofilamentos proteicos. De maneira concatenada, as duas proteínas exercem a importante função de proteção do DNA, reconhecimento e invasão da fita homóloga molde (Liu *et al.*, 2011; Wright, Shah e Heyer, 2018; Piazza e Heyer, 2019; Casari, *et al.*, 2022).

Resumidamente, após a quebra do DNA dupla fita ocorrerá a ressecção de uma das fitas do DNA danificado por meio de endonucleases específicas. Em seguida, RPA se liga à fita simples livre, assegurando a estabilidade do complexo. A recombinase Rad51 substituirá RPA, e juntamente com as proteínas BRCA2 e PALP2, irão invadir o DNA homólogo molde que será utilizado no reparo. Após o reconhecimento da homologia, Rad51 irá remover Rad51 da fita simples, deixando exposta a extremidade 3'OH que é importante para a ligação e extensão da fita por uma DNA polimerase (Mazin *et al.*, 2010; Sebesta *et al.*, 2013; Casari, *et al.*, 2022).

Após extensão total do novo fragmento, a enzima DNA ligase irá atuar unindo as extremidades e uma complexa estrutura será formada entre as fitas de DNA, nomeada de junção de holliday. A junção de Holliday pode ser definida como a junção de quatro cadeias de DNA que liga duas estruturas de DNA duplex, sendo considerada um intermediário da HR e precisa ser resolvido ao final do processo. A enzima DNA Topoisomerase 3 $\alpha$ , juntamente com a helicase BLM - e outras proteínas acessórias - atuam na montagem correta final das fitas de DNA (Bocquet *et al.*, 2014; Song, *et al.*, 2022).

Atualmente já foi demonstrado que HR é um processo essencial utilizado por tripanossomatídeos para lidar com as DSBs, e que a recombinase TcRad51 é uma enzima chave no processo de troca genética em *T. cruzi*. Estudos utilizando radiação gama a 500 Gy para gerar DBS em *T. cruzi* mostraram a capacidade deste parasito se recuperar após 48 horas da exposição. Não somente isso, foi observado também que após 96 horas as células retomavam sua capacidade de crescimento (Regis-da-Silva *et al.*, 2006; Alves, *et al.*, 2018).

Ao se tratar de HR em *T. cruzi*, não podemos deixar de citar o gene Topo3 $\alpha$  que codifica uma importante proteína que atua na resolução final da recombinação, resolvendo as junções de Holliday. Além de seu papel fundamental na recombinação, já se sabe que essa enzima atua também na resposta ao estresse replicativo. Silva e colaboradores, (2019) observaram que células deficientes do gene Topo3 $\alpha$  não reparam de maneira adequada DSBs, demonstrando a importância dessa proteína para essa via de reparo.

Outra proteína importante no processo de recombinação, especialmente o meiótico, é a DMC1, uma recombinase similar à RAD51, mas envolvida com a meiose. Estudos já demonstraram a presença dessa proteína em *Trypanosoma brucei*, um parasito filogeneticamente próximo ao *T. cruzi*. O mais relevante é que DMC1 desempenha um papel importante na formação de células híbridas em *T. brucei* e na meiose. Também foi observado a ausência do papel dessa proteína nos processos de reparo de DNA, eficiência da recombinação e frequência de mutações VSG, corroborando com a hipótese de que ela atua na reprodução sexual desses parasitos. Análises comparativas a partir de sequência de aminoácidos demonstram que DMC1 de *T. brucei* e *T. cruzi* possuem 90% de identidade entre elas, o que é um forte indicativo de que DMC1 talvez esteja envolvido em eventos meióticos em *T. cruzi*, o que torna essa proteína um importante alvo de investigação no processo de hibridização desse parasito (Proudfoot e McCulloch, 2006).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atualmente, sabe-se que a hibridização é um processo que ocorre em vários grupos de parasitos, como *Schistosoma spp*, *Leishmania* e também os *Trypanosomas*. A formação de híbridos pode impactar de maneira significativa a diversificação e evolução desses organismos, ao conferir a eles maior variabilidade genética, o que pode influenciar características importantes como patogenicidade e transmissão. Já foi relatado na literatura a existência de híbridos de *T. cruzi*, porém os dados a respeito desse processo ainda são escassos e o entendimento desse processo é relevante para entender a biologia do parasito.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- Avaliar a taxa de formação de híbridos de *T. cruzi* em sua forma epimastigota em diferentes DTUs e em cepas modificadas em genes de recombinação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar a hibridização entre diferentes DTUs de *T. cruzi*.
- Quantificar a hibridização entre cepas modificadas em genes envolvidos no processo de recombinação.
- Quantificar a hibridização de *T. cruzi* após tratamento com radiação gama.
- Obter células híbridas e estudar as características das mesmas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Cultivo dos parasitos

Na realização deste estudo foram utilizadas formas epimastigotas selvagens e modificadas de *Trypanosoma cruzi*, das linhagens CL Brener (TcVI), Dm28c (TcI) e Y (TcII). Os parasitos foram cultivados em estufa à 28°C em meio Liver Infusion Tryptose – LIT (0,5% de liver digested neutralized, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% de KCL, 0,8% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 µg.mL<sup>-1</sup>, pH 7,4) pH 7.3, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), e também antibióticos específicos para cada linhagem modificada, em que a concentração final é sempre 200 µg/mL de G418® (Geneticin – Gibco) e 200 µg/ml de higromicina (Sigma-Aldrich). Os parasitos heminocautes e superexpressores de RAD51 (CL Brener), superexpressor de DMC1, superexpressor de RAD51 e o knockout de Topoisomera3 alfa (Dm28c) foram construídos anteriormente por nosso grupo de pesquisa.

### 4.2 Ensaio de Fusão citoplasmática utilizando Cell Trace TM Assay

Para o ensaio de fusão citoplasmática, três populações de *T. cruzi* selvagem e cinco geneticamente modificadas foram usadas. As populações selvagens foram da linhagem CL Brener (DTU TcV) - naturalmente híbrida-, Y (DTU TcII) e DM28c (DTU TcI) - não híbridas.

Formas epimastigotas do parasito foram incubadas separadamente com *CellTrace*<sup>TM</sup> CFSE e *CellTrace*<sup>TM</sup> Yellow (*ThermoFisher*) - um marcador de divisão celular que se difunde nas células se ligando de maneira covalente a resíduos de amins livres - de acordo com as instruções do fabricante. 0,5x10<sup>7</sup> células de cada população foram tratadas com 10mM dos respectivos corantes em PBS por 20 min a 28 graus, protegido da luz. Em seguida, 5ml de LIT (10% de BSF) foram adicionados às células por 5 min, a fim de neutralizar o excesso de corante do meio. Logo após, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e ressuspensas em meio fresco, para então serem misturadas e cultivadas a uma concentração final de 1x10<sup>7</sup> em um tubo de ensaio de 1,5 ml - *overnight*. Após 24 horas as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% PBS até o momento de montagem das lâminas.



Células selvagens de CL Brener e Dm28c irradiadas a 500 Gy de radiação gama também foram utilizadas para um ensaio de fusão citoplasmática. Foram coletadas amostras 4 e 24 horas após a irradiação.

### 4.3 Montagem e análise das lâminas – CellTrace

Toda a etapa de montagem da lâmina foi realizada no escuro. Os parasitos já fixados foram aderidos em lamínulas de 13mm tratadas com Poly-L-lisina (Sigma Aldrich) (1:10), por 20 minutos. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS(1X) e tratadas com dicloridrato de 4', 6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI) por 1 minuto (10 µg/mL), para que ocorra a marcação do núcleo e cinetoplasto. As lamínulas foram novamente lavadas, para eliminar o excedente de DAPI e evitar a fluorescência inespecífica. Após a lavagem, as lamínulas foram seladas utilizando o meio de montagem *ProLong Diamond Antifade Mountant* (ThermoFisher).

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

### 4.4 FACs e seleção de híbridos

Para a separação de células híbridas, alíquotas de quatro populações de parasitos CL Brener, CL Brener heminocaute para Rad51 (resistente a Higromicina®), Dm28 e Dm28c superexpressor de DMC1 (resistente a G418®), juntamente com os corantes *CellTrace*<sup>TM</sup> CFSE e *CellTrace*<sup>TM</sup> Far Red Cell foram enviados ao Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz) de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Stenio P. Fragoso e da Dra. Priscila Mazzocchi Hiraiwa que gentilmente realizaram o ensaio de fusão citoplasmática descrito acima, utilizando FACS *scan sorter*. Os híbridos foram selecionados e cultivados e as células enviadas para nosso grupo prosseguir com os estudos em relação às suas características genóticas e fenotípicas. A mistura realizada com CL Brener heminocaute para Rad51 e Dm28c superexpressor de DMC1

foi selecionada em meio contendo os antibióticos G418® e Higromicina®. Os parentais CL Brener e Dm28c também foram cultivados em meio contendo ambos antibióticos.

#### 4.5 Extração de DNA Genômico

Foi realizada a extração do DNA genômico de acordo com o protocolo de extração de DNA com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e solução de lise de Madisen (SAMBROOK *et al.*, 1989), que foi adaptado para uso em epimastigotas de *T. cruzi*. Para a etapa de lise celular, foram adicionados 300 µL de solução de lise de Madisen (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0; SDS 0,5%; NaCl 10mM) previamente aquecida a 55°C em um pellet contendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  células. Em seguida, foram adicionados 10µL de Proteinase K (20mg/mL; armazenada a -20°C). O conteúdo foi homogeneizado rapidamente no vórtex e incubado a 55°C em banho maria por 5 minutos. Para a separação da fase da solução contendo o DNA, foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1 ao lisado, o qual foi agitado por 10 segundos por inversão lenta e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e o restante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (proporção 24:1). Após agitação por inversão lenta por 10 segundos, o conteúdo foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 7,5M e 1 volume de isopropanol 95-100% gelados neste sobrenadante. O conteúdo foi incubado overnight no freezer e, posteriormente, foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Ao final, para a remoção de sais e pequenas moléculas inorgânicas, foram adicionados 100µL de etanol 70% ao pellet. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado e o pellet foi deixado em temperatura ambiente para evaporação do etanol. O DNA purificado foi ressuspendido em 50µL de água mili-Q autoclavada e dosado no espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*).

#### 4.6 Genotipagem por PCR e eletroforese em gel de poli-acrilamida

Os parasitos isolados (Clones CL Brener + Dm28c e CL Brener heminocaute para Rad51+ Dm28c superexpressor de DMC1) foram genotipados utilizando a técnica de PCR e os marcadores escolhidos foram o COII, um gene codificador da subunidade II da proteína citocromo oxidase. Este gene se localiza no genoma mitocondrial, especificamente no maxicirculo do *T. cruzi*, tendo em torno de 20 a 50 cópias (de Freitas *et al.* 2006). O DNA genômico também foi

analisado utilizando-se do marcador rDNA 24S $\alpha$ , que codifica a subunidade maior do ribossomo de *T. cruzi* que é dividida em dois rRNAs de alto peso molecular: 24Sa e 24Sb (Souto *et al.* 1996).

Para as reações de PCR foram utilizados Tampão GoTaq 1X, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 40 uM dNTPs, 0,75 U Taq, 10 pM de cada primer e 100ng do DNA genômico dos parasitos. Cada um destes marcadores apresenta um programa de PCR diferente, conforme indicado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Primers e programas utilizados na genotipagem dos clones de *T. cruzi*.

	<b>COII</b>	<b>rDNA 24 Sa</b>
<b>Primer forward</b>	CCATATATTGTTGCATTATT	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
<b>Primer reverse</b>	TTGTAATAGGAGTCATGTTT	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT
<b>Desnaturação inicial</b>	94 °C por 5 min	94 °C por 10 min
<b>Desnaturação</b>	94 °C por 45 s	94 °C por 30 s
<b>Anelamento</b>	45 °C por 45s	60 °C por 30 s
<b>Extensão</b>	72 °C por 1 min	72 °C por 30s
<b>Número de ciclos</b>	40	30
<b>Extensão final</b>	72 °C por 1 min	72 °C por 30s

Após amplificação, as amostras contendo o amplicon do marcador COII foi digerido com a enzima de restrição AluI, na proporção de 1U para cada 20 $\mu$ L de reação de PCR, a 37°C

por 12 a 16 horas. Depois, as amostras resultantes das ampliações e digestões foram utilizadas em uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coradas com brometo de etídio. Para a correta genotipagem dos parasitos, os padrões de bandas obtidos nos géis foram comparados com aqueles específicos para cada linhagem do parasito (Tabela 2).

**Tabela 2** - Perfil de amplificação dos marcadores utilizados na genotipagem dos subgrupos de *T. cruzi*. Cada valor representa uma banda no gel de poliacrilamida. pb = pares de base.

<b>Linhagem</b>	<b>COII</b>	<b>rDNA 24 S<math>\alpha</math></b>
<b>TcI</b>	30, 81 e 264pb	110pb
<b>TcII</b>	81, 82 e 212pb	125pb
<b>TcIII</b>	81 e 294pb	110pb
<b>TcIV</b>	81 e 294pb	125pb
<b>TcV</b>	81 e 294pb	110 e 125pb
<b>TcVI</b>	81 e 294pb	125pb

#### **4.7 Curva de crescimento**

Para a curva de crescimento células em exponencial foram diluídas para a concentração inicial de  $1 \times 10^7$  células por ml, e o crescimento das culturas foi acompanhado por contagem em câmara de Neubauer até atingirem a fase estacionária. Durante a contagem, foi usado o corante vital eritrosina (0,04% em PBS, pH 7,4) para diferenciar células vivas e mortas.

#### **4.8 Curvas de crescimento pós tratamento com radiação gama**

Para a curva de crescimento, as células de *Trypanosoma cruzi* ( $1 \times 10^7$ /ml em 10 ml de LIT) foram irradiadas a uma dose de 500Gy de radiação gama, assim como previamente estipulado em estudos anteriores do nosso grupo (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Os parasitos foram expostos a raios gama oriundos de uma fonte de cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ), disponível no CNEN/CDTN, Instituto de Pesquisa do Ministério de Ciência e Tecnologia localizado no campus da UFMG. A taxa de dose utilizada neste trabalho foi de 857Gy/h. Após irradiação, as culturas foram utilizadas em ensaios de curva de crescimento. Os controles negativos foram submetidos às mesmas condições metodológicas dos irradiados, desde o meio de cultivo até o transporte ao CDTN, porém sem entrar na sala de irradiação. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer utilizando o corante vital eritrosina (0,04% em PBS, pH 7,4) para diferenciar células vivas e mortas.

#### **4.9 Estatística**

Para as curvas de crescimento e de dormência de *T. cruzi*, e os ensaios de fusão citoplasmática foram utilizados o teste t não-pareado. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

Foram realizados no mínimo três experimentos independentes. Os resultados mostrados nos gráficos correspondem às médias dos experimentos e as barras ao desvio padrão.

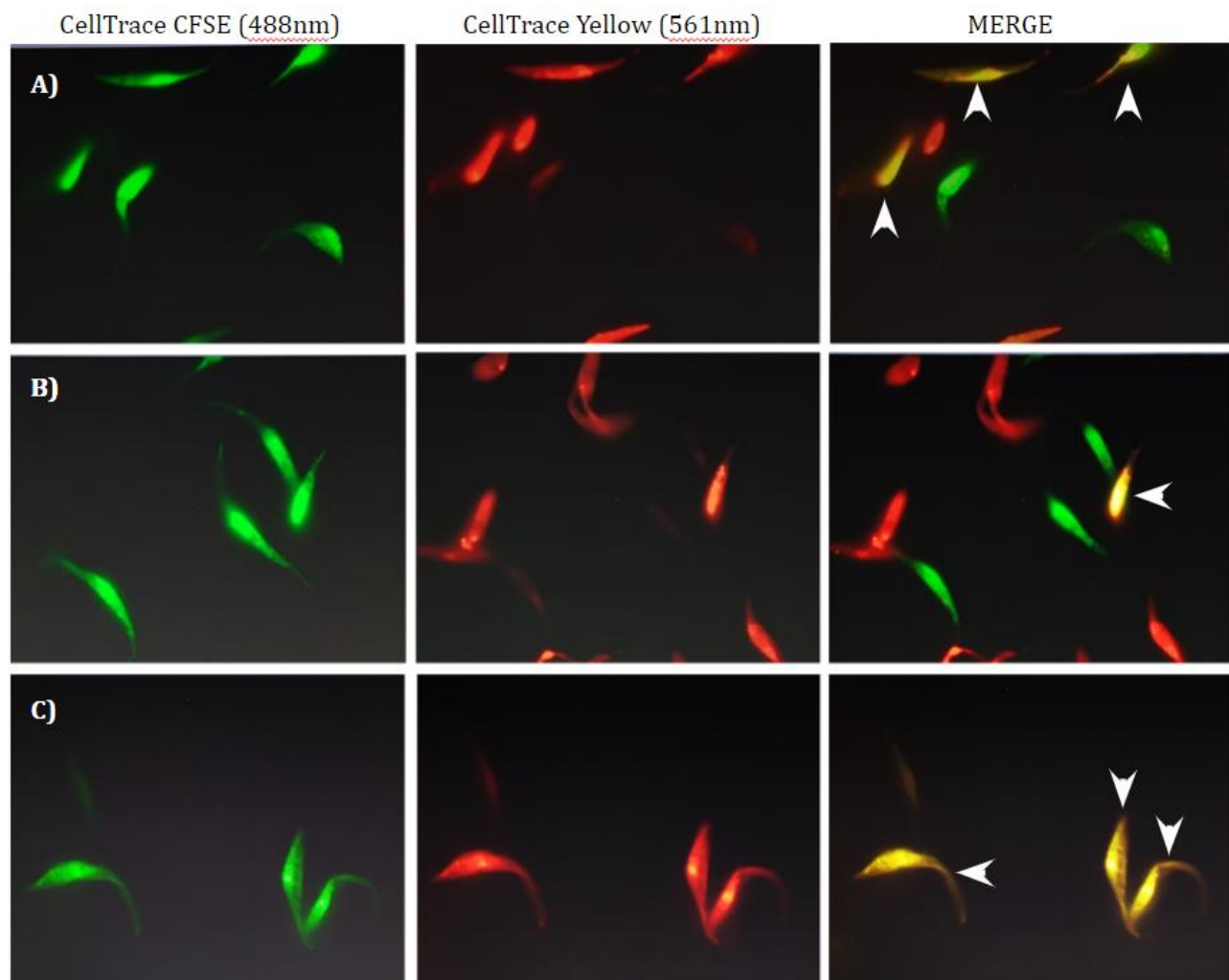
## 5. RESULTADOS

### 5.1 A fusão citoplasmática não é um evento constante em *T. cruzi*

Estudos anteriores realizados por nosso grupo demonstraram que *T. cruzi* é capaz de realizar fusão citoplasmática, além de realizar a troca de seu material genético (Alves *et al.*, 2018, Repolês, 2019; Resende, 2019). Para aprofundar a investigação sobre o processo de hibridização, avaliamos diferentes DTUs, bem como células modificadas geneticamente em genes de recombinação (forma epimastigota), para realizar um estudo dos eventos de hibridização.

Para a realização deste projeto, primeiro testamos se a cepa CL Brener (TcVI) ainda mantinha a capacidade de formar híbridos. Para analisar a porcentagem média de formação de híbridos nas misturas de parasitos foi utilizado dois marcadores de duplicação distintos, *CellTrace CFSE* (488nm) e *CellTrace Yellow* (561nm). Após o tratamento, como detalhado na metodologia, foi feita a contagem manual dos híbridos. A porcentagem foi calculada sob o número de 200 células observadas em imagens de microscópio de fluorescência. Os híbridos podem ser identificados por possuírem dupla marcação, conferindo fluorescência tanto nos comprimentos de onda de 488nm quanto no de 561nm, um indicativo de que aquela célula possui os dois marcadores em seu citoplasma.

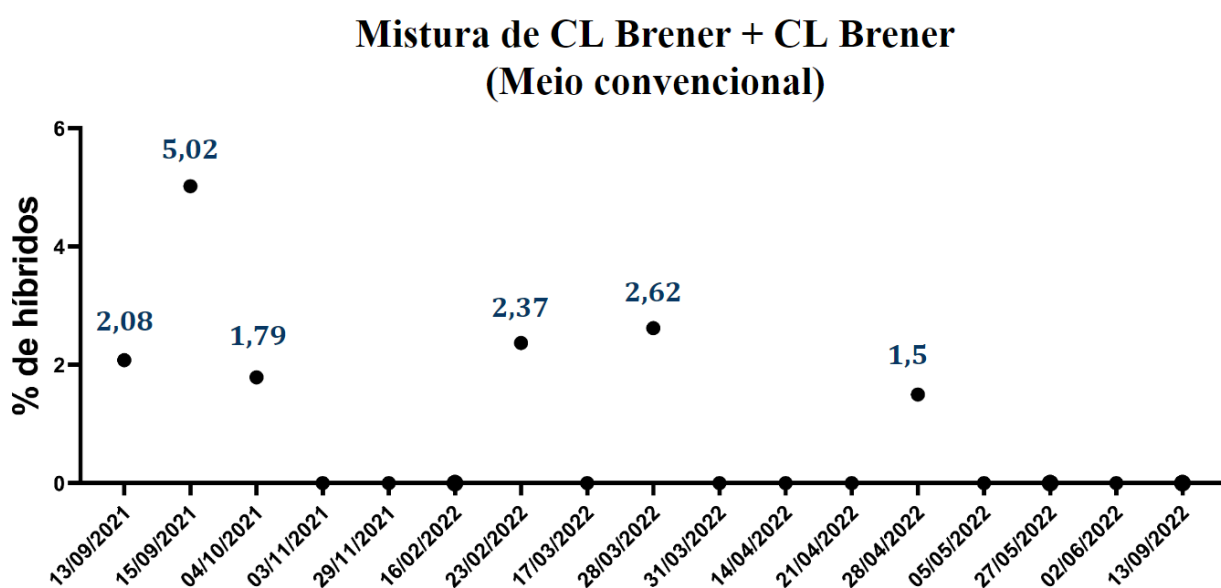
Através de imagens de microscopia de fluorescência, foi possível observar a presença de células de *T. cruzi* duplo marcadas (Figura 5.C), evidenciando a fusão citoplasmática. Ao confirmar a capacidade das células de fundir seu citoplasma, foi estabelecido que a mistura CL Brener wt (wild type) + CL Brener wt seria utilizada como controle.



**Figura 5: Imagens de microscopia de fluorescência de epimastigotas com dupla marcação (CFSE em verde e Yellow em vermelho).** As setas brancas destacam os parasitos em amarelo, representando células com dupla marcação de *CellTrace*, evidenciando os híbridos formados, após 24 horas do experimento. A) Imagem amplificada de parasito da mistura CL Brener + Dm28c superexpressando DMC1. B) Imagem amplificada de parasito da mistura CL Brener + Dm28c superexpressando Rad51. C) Imagem amplificada de parasito da mistura CL Brener + CL Brener.

Agrupando os dados de todas as replicatas onde misturas de CL Brener wt + CL Brener wt foi utilizado como controle, conseguimos fazer um mapeamento que nos permite observar que os eventos de fusão citoplasmáticas não seguem um padrão determinado, apresentando uma alta variação ao longo do tempo (Fig. 6). As primeiras triplicatas, realizadas nos dias 13 e 15 de setembro e 04 de outubro de 2021, foram as que mais apresentaram células híbridas (2,08%, 5,02% e 1,79%, respectivamente) e é o único período que foi possível observar consecutivamente a presença de células híbridas. Depois desse período, passaram-se vários

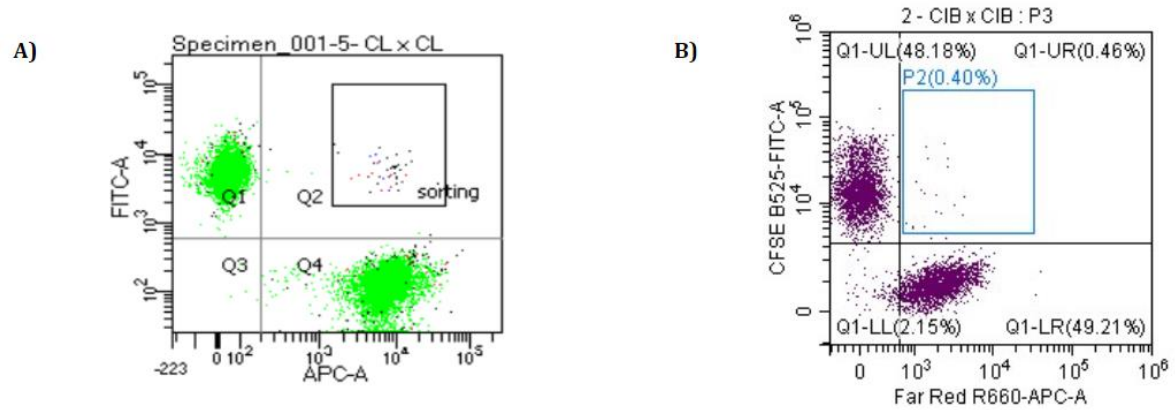
meses sem que fosse observado células híbridas nas misturas. É interessante observar que mesmo quando a célula volta a apresentar híbridos, estes estão em uma porcentagem que não atinge o pico verificado no começo do trabalho e surgem em tempos espaçados, o que pode indicar que a fusão de células de *T. cruzi* não é um evento de ocorrência constante. Devido ao fato de em vários momentos não serem observadas nenhuma célula duplo marcada, a média final das 17 repetições foi de 0,904%.



**Figura 6: Taxa de hibridização da cepa CL Brener (TcVI) ao longo do tempo.** A média de híbridos para as misturas CL Brener mais CL Brener, em contagem de células duplo marcadas foi de 0,904%. Os parasitos foram cultivados em meio autoclavado enriquecido com 10% de SFB. Foram analisadas 200 células em triplicatas independentes. As datas foram organizadas na ordem das replicatas mais antigas para as mais recentes.

O mesmo ensaio de fusão citoplasmática foi realizado no Instituto Carlos Chagas do Paraná, em parceria com o Dr. Stenio P. Fragoso e Dra. Priscila Mazzocchi Hiraiwa, porém, utilizou-se FACS para quantificar. O primeiro experimento foi realizado em setembro de 2021, e em uma contagem de cerca de 10 mil células foram identificadas apenas 5 híbridas de CL Brener + CL Brener. Sete meses depois, em março de 2022, foram observados 19 células duplo marcadas, em uma contagem de 20 mil células (Fig. 7). Estes dados, juntos, demonstram que a hibridização é um evento raro em *T. cruzi*.

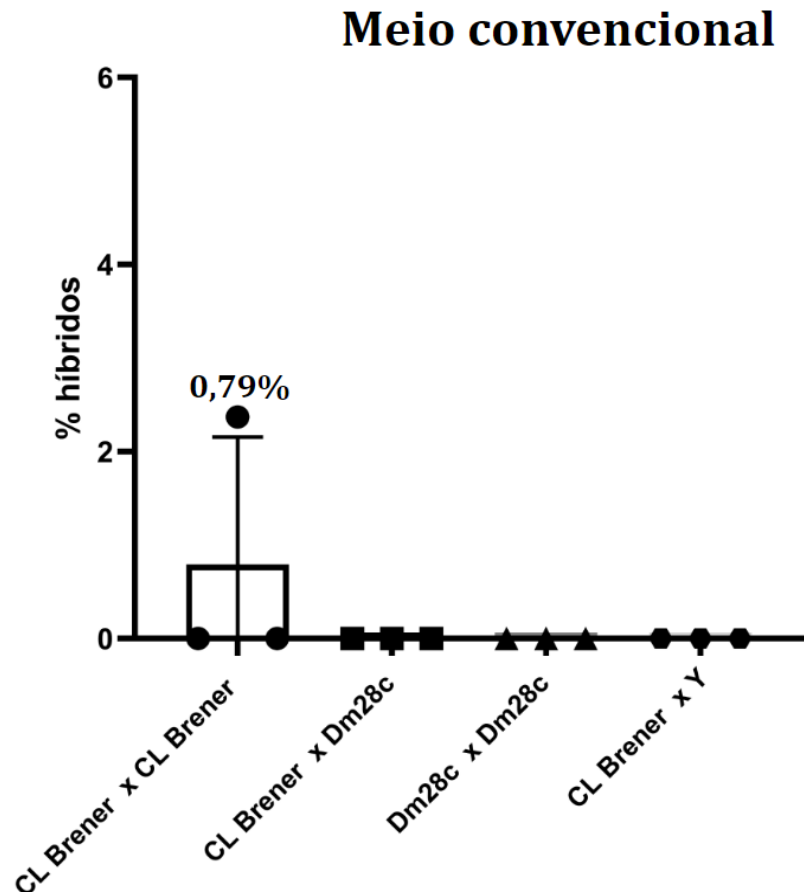




**Figura 7: Taxa de hibridização da cepa CL Brener (TcVI) quantificado em FACS.** A) a porcentagem de híbridos para as misturas CL Brener mais CL Brener, em contagem de células duplo marcadas foi de 0%, na primeira repetição do ensaio de fusão citoplasmática. B) a porcentagem de híbridos para as misturas CL Brener mais CL Brener, em contagem de células duplo marcadas foi de 0,1%, na primeira repetição do ensaio de fusão citoplasmática. Foram utilizados CellTrace CFSE (488 nm) e CellTrace Far Red (633/635 nm).

## 5.2 CL Brener aparenta maior aptidão para a formação de células fusionadas

Após a confirmação de que CL Brener mantém a capacidade de formar híbridos, foi realizado um ensaio de fusão citoplasmática com misturas de CL Brener wt (TcVI) com outras DTUs, como as cepas Dm28c wt (TcI) e Y (TcII). Observamos que misturas de diferentes cepas não apresentaram células duplo marcadas em nenhuma das três triplicatas (Fig. 8). A própria mistura controle, contendo apenas CL Brener, teve uma baixa incidência de células híbridas, sendo possível observar células duplo marcadas em apenas uma das três replicatas.

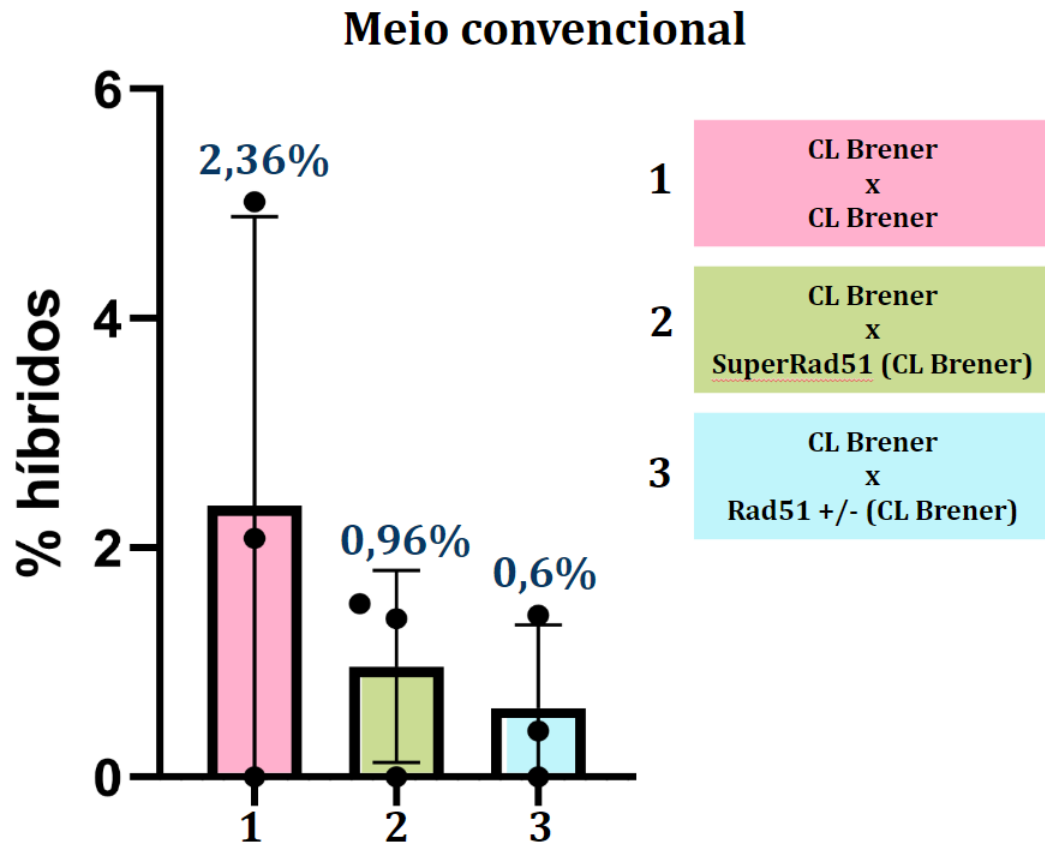


**Figura 8: Taxa de hibridização em diferentes cepas de *T. cruzi*.** Média de híbridos para as misturas CL Brener mais CL Brener, CL Brener mais Dm28c e CL Brener mais Y, em contagem de células duplo marcadas. Os parasitos foram cultivados em meio autoclavado enriquecido com 10% de SFB. Foram analisadas 200 células em triplicatas independentes. Valor de p 0,1973.

### 5.3 Os genes envolvidos na recombinação influenciam na fusão citoplasmática

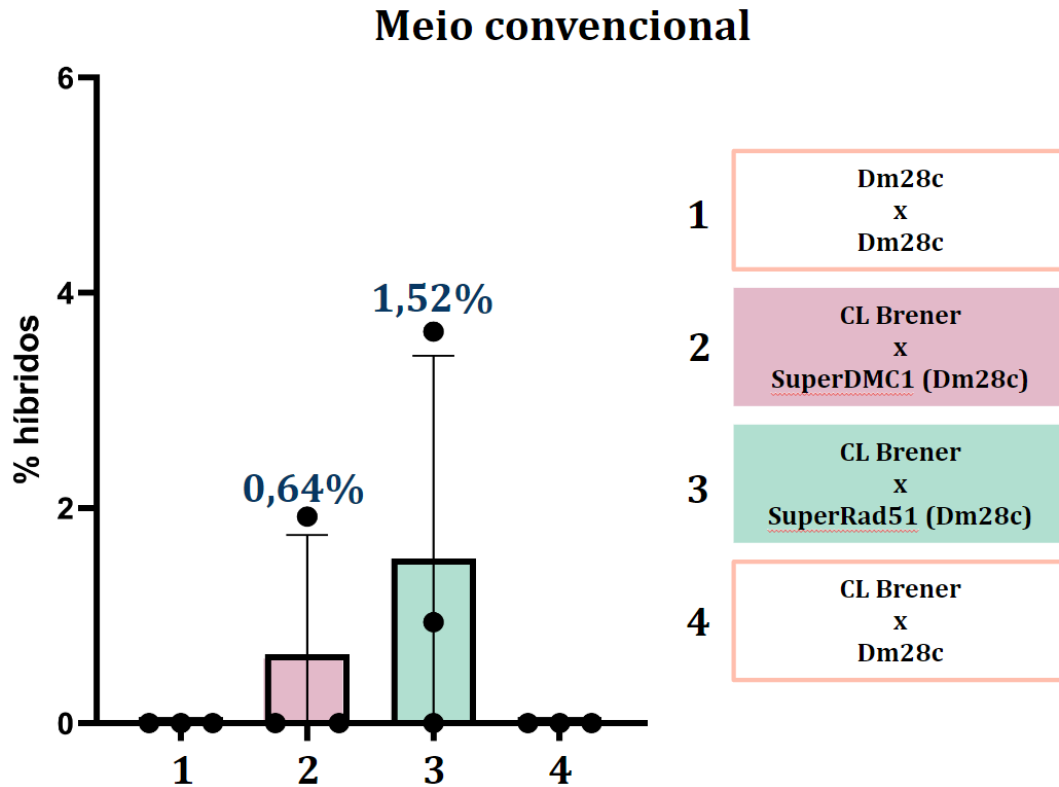
Uma importante observação realizada por nosso grupo é que DTUs naturalmente híbridas de *T. cruzi*, como CL Brener e Bug2419, apresentam elevada expressão de Rad51, uma recombinase com papel central na recombinação do DNA (Resende, 2019). Somando isso ao fato de CL Brener possuir maior capacidade de fusão citoplasmática, realizamos o ensaio de fusão citoplasmática com células superexpressoras de Rad51. Observamos, porém, que ao adicionar tais células mutadas houve uma tendência de diminuição da taxa de hibridização entre as misturas, quando comparadas ao controle. Outra observação importante é que células

heminocaute para o gene em questão tiveram uma taxa de fusão citoplasmática ainda menor quando comparado à mistura controle contendo somente CL Brener (Figura 9).



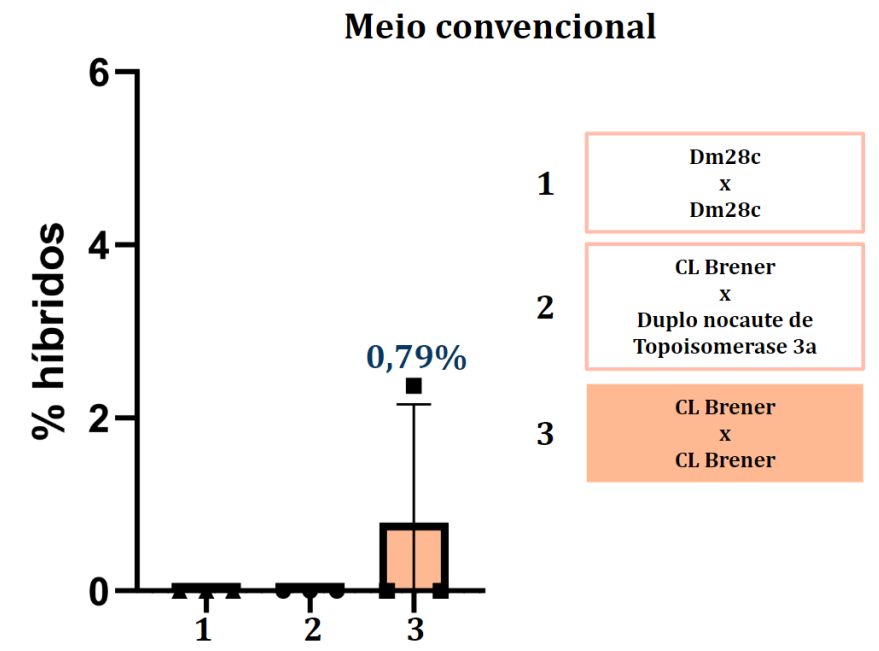
**Figura 9: Taxa de hibridização *T. cruzi* de DTU TcVI (CL Brener) geneticamente modificados.** 1 média de híbridos para as misturas CL Brener + CL Brener, 2 CL Brener + Super expressor de Rad51 (CL Brener) e 3 CL Brener wt x Rad51 +/- (CL Brener), em contagem de células duplo marcadas. Os parasitos foram cultivados em meio autoclavado enriquecido com 10% de SFB. Foram analisadas 200 células em triplicatas independentes.

Já parasitos da cepa Dm28c superexpressando os genes RAD51 ou DMC1 (recombinase envolvida na recombinação meiótica) aumentaram a taxa de fusão citoplasmática quando comparados à mistura de CL Brener e Dm28c wt (Fig.10).



**Figura 10: Taxa de hibridização de *T. cruzi* de DTU TcI (Dm28c) geneticamente modificados e DTU TcVI (CL Brener) wt.** 1 Média de híbridos para as misturas Dm28c + Dm28c, 2 CL Brener + Super expressor de DMC1 (Dm28c), 3 CL Brener wt x Super expressor de Rad51 (Dm28c) e 4 CL Brener + Dm28c, em contagem de células duplo marcadas. Os parasitos foram cultivados em meio autoclavado enriquecido com 10% de SFB. Foram analisadas 200 células em triplicatas independentes.

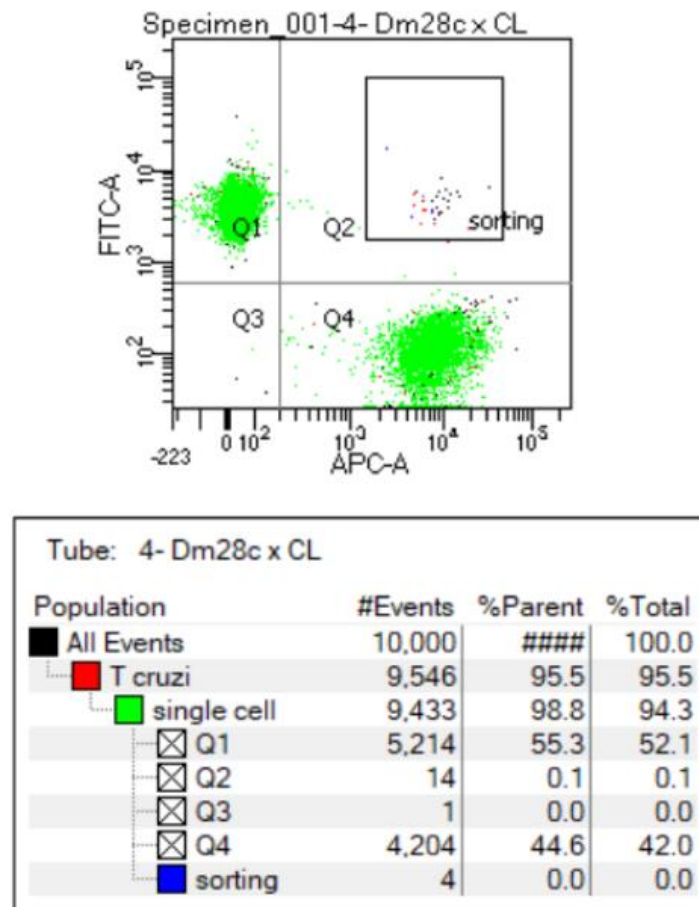
Uma vez que que genes que iniciam o processo de recombinação foram capazes de aumentar a fusão citoplasmática entre cepas de diferentes DTUs, decidimos testar células duplo nocautes para Topoisomerase 3 $\alpha$  (TOPO 3 $\alpha$  KO), que está envolvida no final do processo de recombinação, e observamos que a deficiência dessa enzima não influenciou no resultado encontrado na mistura com o parental Dm28c (Fig. 11).



**Figura 11: Taxa de hibridização de Dm28c Duplonocaute de Topoisomerase 3-alfa.** 1 média de híbridos para as misturas Dm28c + Dm28c, 2 CL Brener + Duplonocaute de Topoisomerase 3 alfa (Dm28c) e 3 CL Brener + CL Brener, em contagem de células duplo marcadas. Os parasitos foram cultivados em meio autoclavado enriquecido com 10% de SFB. Foram analisadas 200 células em triplicatas independentes.

#### 5.4 A nutrição pode estar envolvida com a capacidade de *T. cruzi* formar híbridos

Curiosamente, os dados encontrados nesta pesquisa diferem dos resultados encontrados anteriormente no trabalho de Resende (2019), onde foi observado uma taxa de 7% de híbridos em ensaio de fusão citoplasmática com a mistura CL Brener wt, quantificado em microscópio de fluorescência e uma taxa de até 8% em mistura contendo CL Brener wt e Dm28c wt, quantificado em citômetro. Em contrapartida, quando quantificada a mistura de CL Brener e Dm28c recentemente, observa-se uma drástica queda na quantidade de híbridos (Fig. 12), sendo encontrado apenas 4 células híbridas em uma contagem total de 10 mil eventos, totalizando 0% de híbridos, em um dos ensaios realizados.



**Figura 12: Taxa de hibridização da mistura de CL Brener com Dm28c.** A porcentagem de híbridos para as misturas CL Brener mais Dm28c, tratadas independentemente com CellTrace CFSE (488 nm) e CellTrace Far Red (633/635 nm), foi de 0%.

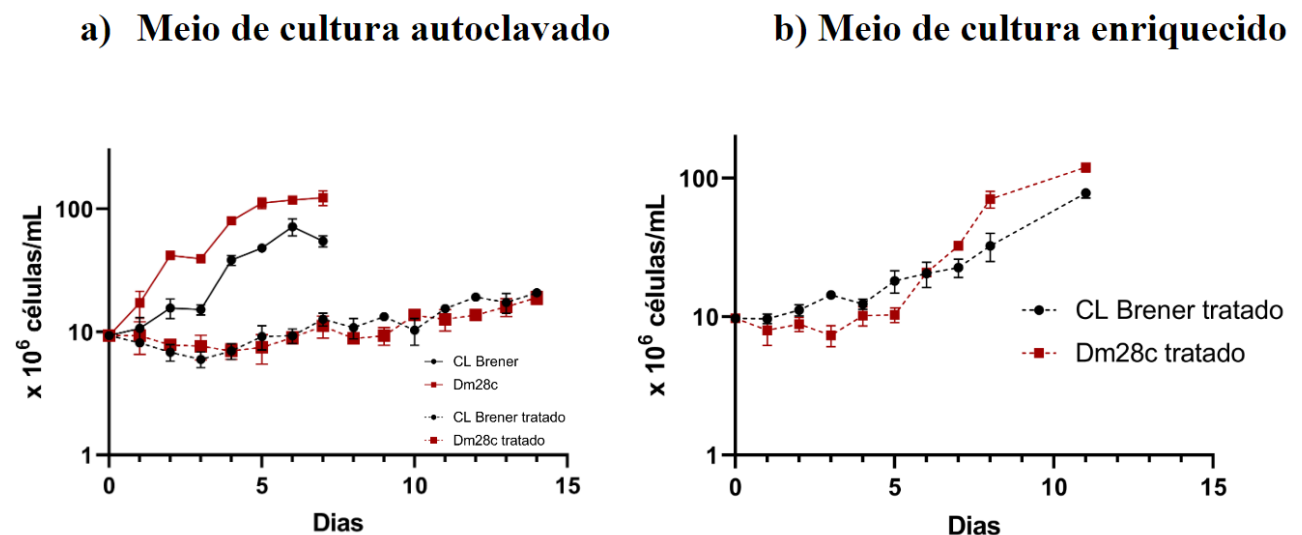
Após analisarmos os resultados, uma hipótese levantada é que a nutrição pode estar influenciando as condições de crescimento e de fusão citoplasmática desses organismos. Para investigar tal hipótese, cultivamos populações de CL Brener e Dm28c em meio LIT filtrado, cujo valor nutricional é superior ao do meio de cultura autoclavado.

Primeiramente, realizamos uma curva de crescimento sob condições normais e pós dano duplo de DNA, induzido por 500 Gy de radiação gama em parasitos de diferentes DTUs cultivados em meio autoclave e em meio enriquecido filtrado. Observamos que as células cultivadas em meio autoclavado que foram irradiadas apresentaram grande dificuldade em voltar o crescimento, diferindo dos resultados encontrados por outros pesquisadores do nosso grupo (Fig. 13a), que mostram que CL Brener é capaz de recuperar seu crescimento em 6 dias (Gomes Passos Silva *et al.*, 2018).

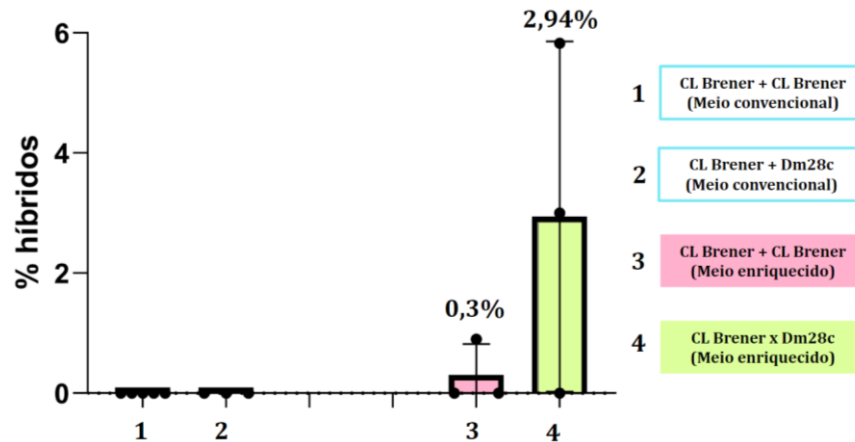
Essa diferença de crescimento após dano do DNA sugere alguma alteração na via de reparo por HR. E de fato, ao compararmos os dados anteriores com os encontrados após o cultivo das células em meio enriquecido (filtrado) percebe-se que a nutrição pode interferir na resposta desses paracitos ao dano de DNA, uma vez que em meio mais rico a retomada do crescimento pós irradiação volta ao padrão normal (Fig. 13b).

Com isso, foi decidido realizar o ensaio de fusão citoplasmática com as populações cultivadas em meio enriquecido, e observou-se um ligeiro aumento na quantidade de células híbridas na mistura de CL Brener + CL Brener (Fig. 14), quando comparada com as 5 últimas replicadas realizadas com as células cultivadas em meio autoclavado.

Entretanto, ao comparar os dados da mistura de CL Brener e Dm28c realizados com meio autoclavado, nota-se um aumento na taxa e frequência de híbridos, não antes observados. Tanto em contagem manual realizada por microscopia de fluorescência quanto por citômetro, a quantidade de híbridos encontrada para tal mistura não era grande o suficiente para que a porcentagem fosse diferente de 0%. Porém, nas três replicatas realizadas em meio filtrado foi possível observar uma média de 2,94%. É importante também ressaltar que foram encontrados híbridos em duas das três replicatas e que em uma delas foi observado a presença de 5,83% de células duplo marcadas.



**Figura 13: Curva de crescimento de células de *T. cruzi* selvagens em meio autoclavado. a)** Curva de crescimento em condições normais e também após tratamento com 500 Gy de radiação gama de células de CL Brener e Dm28c cultivadas em meio autoclavado. **b)** Curva de crescimento após tratamento com 500 Gy de radiação gama de células de CL Brener e Dm28c cultivadas em meio enriquecido (autoclavado).



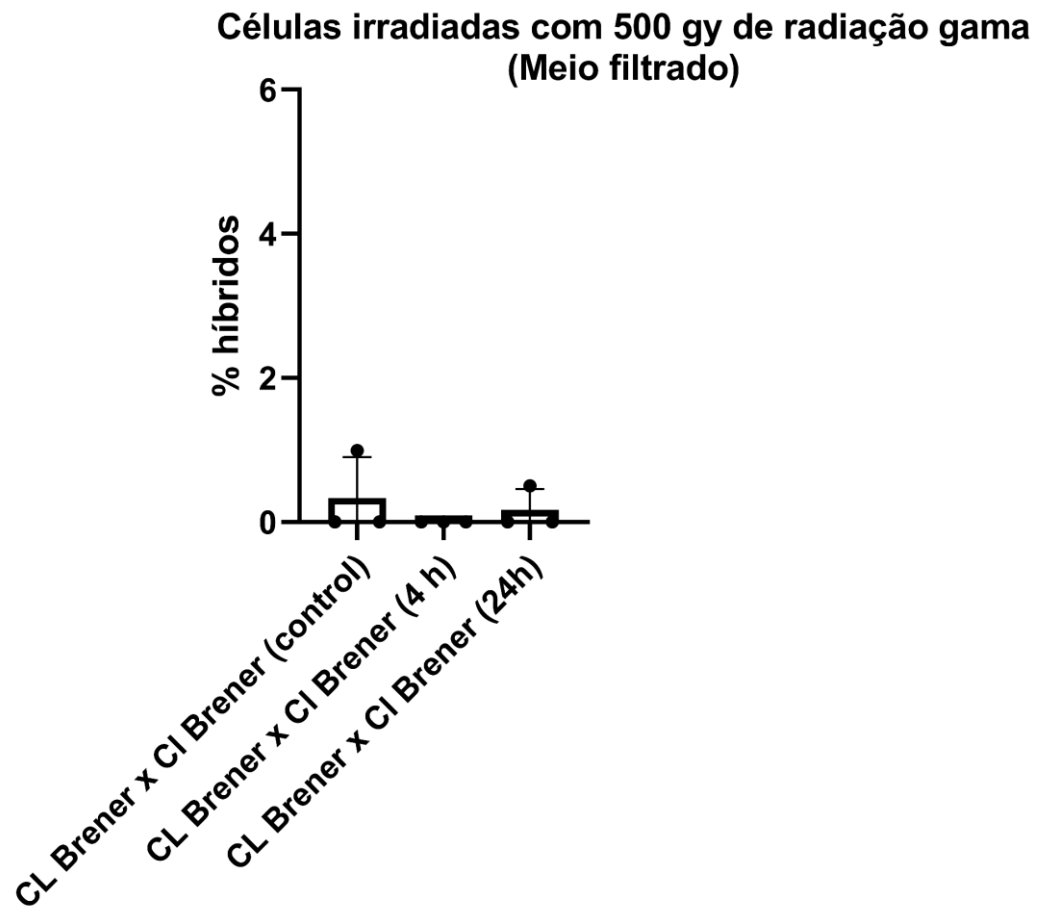
**Figura 14: Comparação da formação de células fusionadas de CL Brener + Dm28c cultivadas em meio autoclavado ou filtrado.** Em meio autoclavado não foi possível observar a formação de fusão citoplasmática, enquanto em meio filtrado observa-se a presença de células duplo marcadas. Foram analisadas 200 células em triplicatas independentes

### 5.5 O tratamento com radiação gama não induziu significativamente o número de células fusionada

Um estudo realizado em 2022 observou que células de *Leishmania* submetidas a condições de estresse tendem a formar mais híbridos do que em condições normais (Louradour, *et al.*, 2022). Para testar se isso também ocorre em *T. cruzi*, irradiamos duas populações de DTUs diferentes (CL Brener - TcVI e Dm28c - TcII) a 500 Gy de radiação gama. Coletamos amostras logo após, 4 horas e 24 horas após o tratamento e as submetemos ao protocolo de marcação celular, como descrito na metodologia.

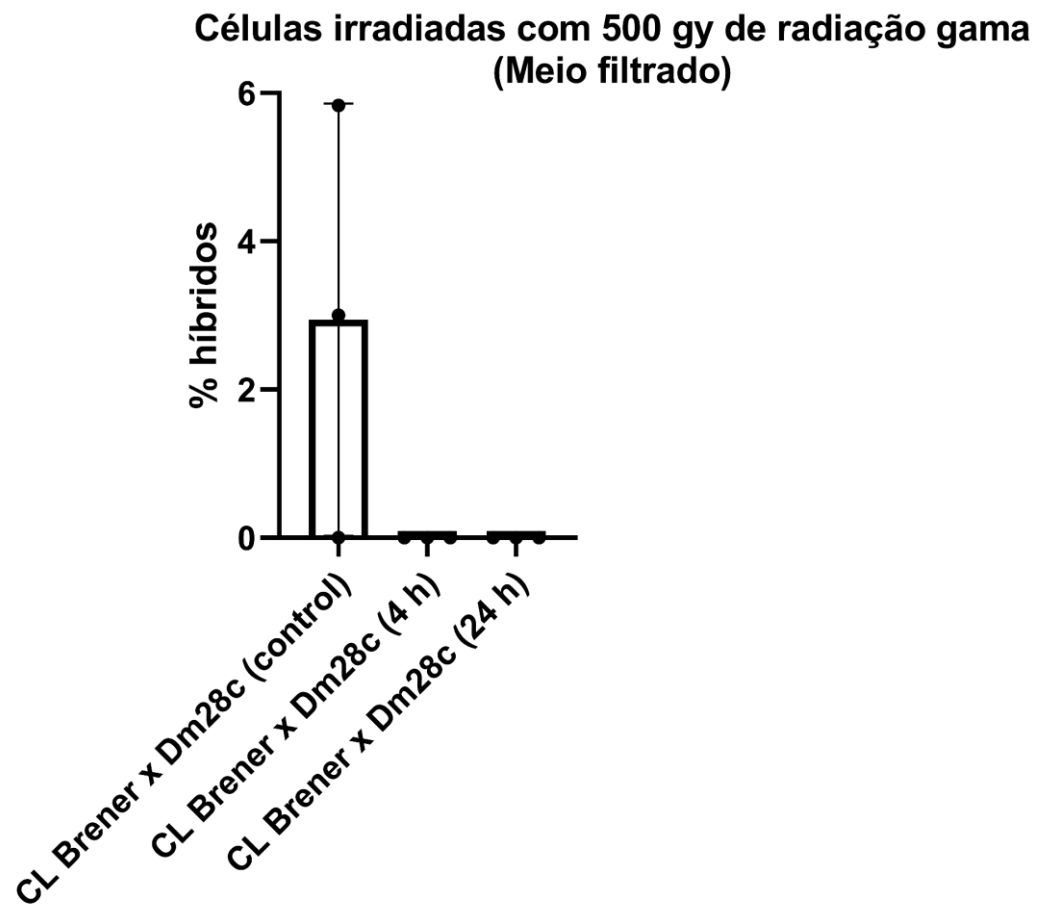
Diferente dos dados encontrados por Louradour e colaboradores (2022), o tratamento com radiação gama não foi capaz de induzir a formação de células híbridas em misturas de CL Brener. Ao contrário, as células irradiadas apresentaram uma redução na quantidade de híbridos quando comparadas ao controle não irradiado nas primeiras horas após o tratamento (Fig. 15).





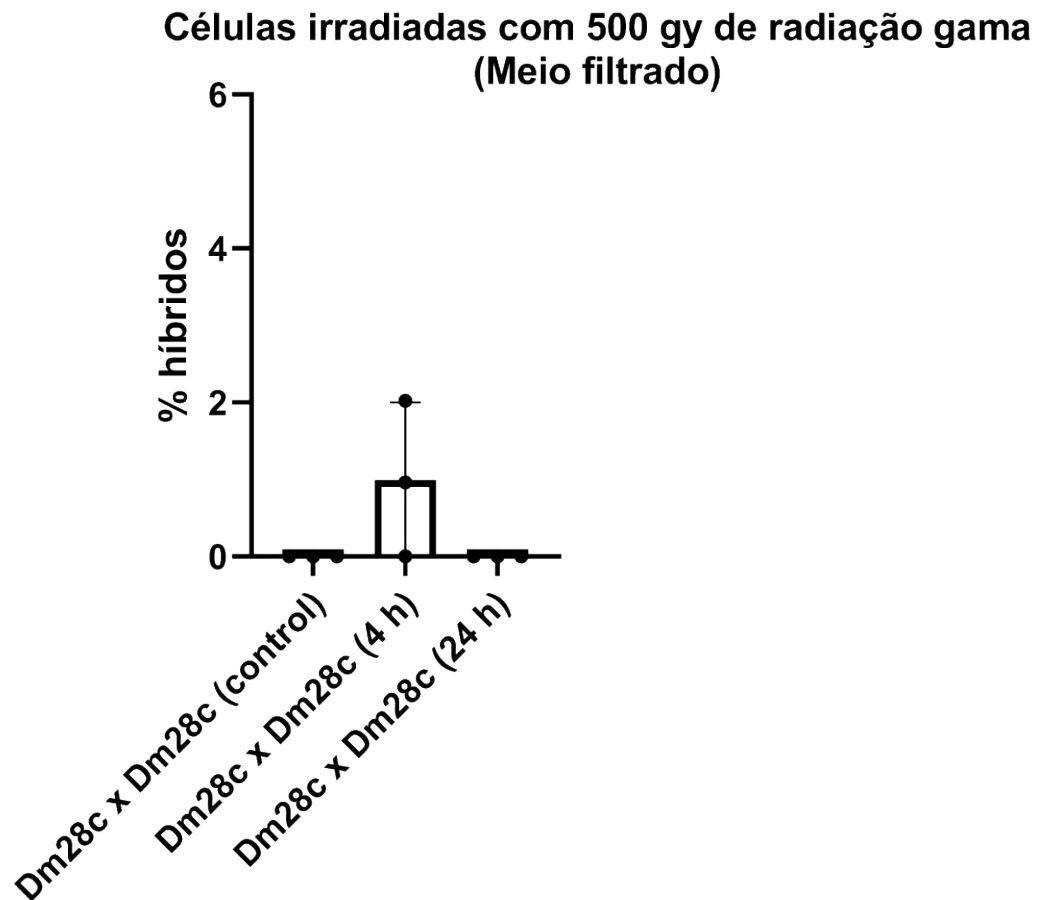
**Figura 15: Taxa de hibridização em misturas de *T. cruzi* após tratamento com radiação gama e cultivo em meio filtrado.** Porcentagem total de células duplo marcadas após a mistura entre as células com tratamentos independentes de CellTrace CFSE (488 nm) e o CellTrace Yellow (561 nm) nos tempos de 4 e 24 h para as cepas CL Brener.

Analisando as misturas de CL Brener e Dm28 fica mais evidente que o tratamento com radiação gama não foi eficiente na indução de híbridos e tanto em 4 quanto 24h não foi possível observar a presença de células duplo marcadas (Fig. 16).



**Figura 16:** Taxa de hibridização em misturas de *T. cruzi* após tratamento com radiação gama e cultivo em meio filtrado com misturas de CL Brener + Dm28c. Porcentagem total de células duplo marcadas após a mistura entre as células com tratamentos independentes de CellTrace CFSE (488 nm) e o CellTrace Yellow (561 nm) nos tempos de 4 e 24 h para as cepas CL Brener.

Curiosamente, na mistura Dm28c foi possível observar células duplo marcadas no tempo de 4 horas após tratamento, o que até então não havia sido visto nessa mistura (Fig. 17).



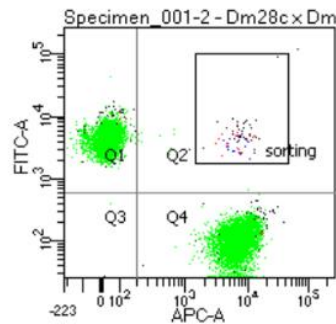
**Figura 17:** Taxa de hibridização em misturas de *T. cruzi* após tratamento com radiação gama e cultivo em meio filtrado com misturas de CL Brener + Dm28c. Porcentagem total de células duplo marcadas após a mistura entre as células com tratamentos independentes de CellTrace CFSE (488 nm) e o CellTrace Yellow (561 nm) nos tempos de 4 e 24 h para as cepas CL Brener.

### 5.6 É possível selecionar e cultivar células duplo marcadas com o FACS

Utilizando uma estratégia parecida com a do ensaio de fusão citoplasmática, populações de *T. cruzi* Dm28c (TcI) e CL Brener (TcVI) foram corados isoladamente com CellTrace CFSE e CellTrace For Red. Posteriormente, essas células foram cultivadas juntas *overnight* e passadas no FACS para quantificação e seleção. Foram realizadas 3 misturas, CL Brener mais CL Brener, CL Brener mais Dm28c e Dm28c mais Dm28c.

Células duplo marcadas foram selecionadas em todas as misturas realizadas, mesmo nas mais baixas como CL Brener mais Dm28c que tiveram apenas 4 eventos de fusão citoplasmática em 10 mil eventos totais. Após a separação por sorting, os clones duplo marcados foram cultivados isoladamente em meio LIT fresco até alcançarem a turbidez necessária para o cultivo em garrafa de cultura (Fig. 18).

A)



Tube: 2 - Dm28c x Dm28c			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
T cruzi	9,617	96.2	96.2
single cell	9,560	99.4	95.6
Q1	4,893	51.2	48.9
Q2	25	0.3	0.2
Q3	1	0.0	0.0
Q4	4,641	48.5	46.4
sorting	15	0.2	0.2

B)

Crescimento de 81% das células recuperadas

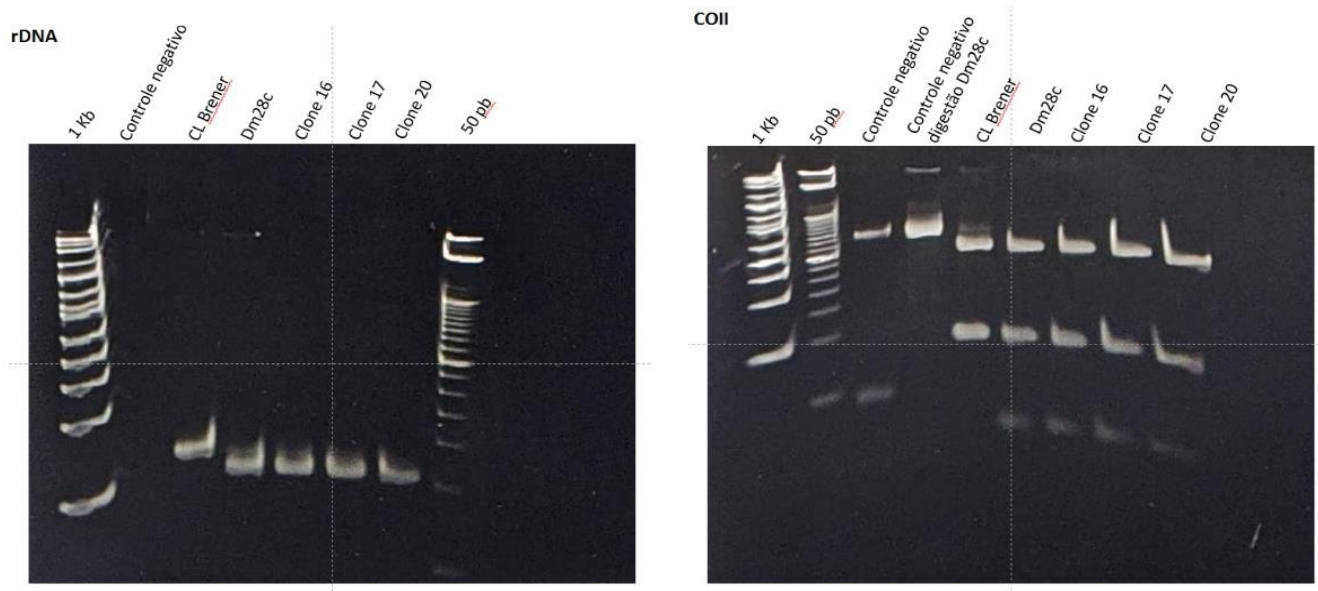


**Figura 18: Taxa de hibridização da mistura de Dm28c mais Dm28c.** A) porcentagem de híbridos para as misturas Dm28c mais Dm28c, tratadas independentemente com CellTrace CFSE (488 nm) e CellTrace Far Red (633/635 nm). B) Quantificação do crescimento dos parasitos duplos marcados recuperados por FACS.

### 5.7 PCR de genotipagem dos clones isolados da mistura de CL Brener e Dm28c

Um total de  $8 \times 10^7$  de clones de células híbridas, separadas no FACS, foi utilizado para extração de DNA, posteriormente foi realizada uma PCR convencional para os marcadores COII e rDNA 24S $\alpha$ , visualizado em gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio. Ao revelar o gel notamos que todos os clones selecionados apresentaram maior semelhança ao

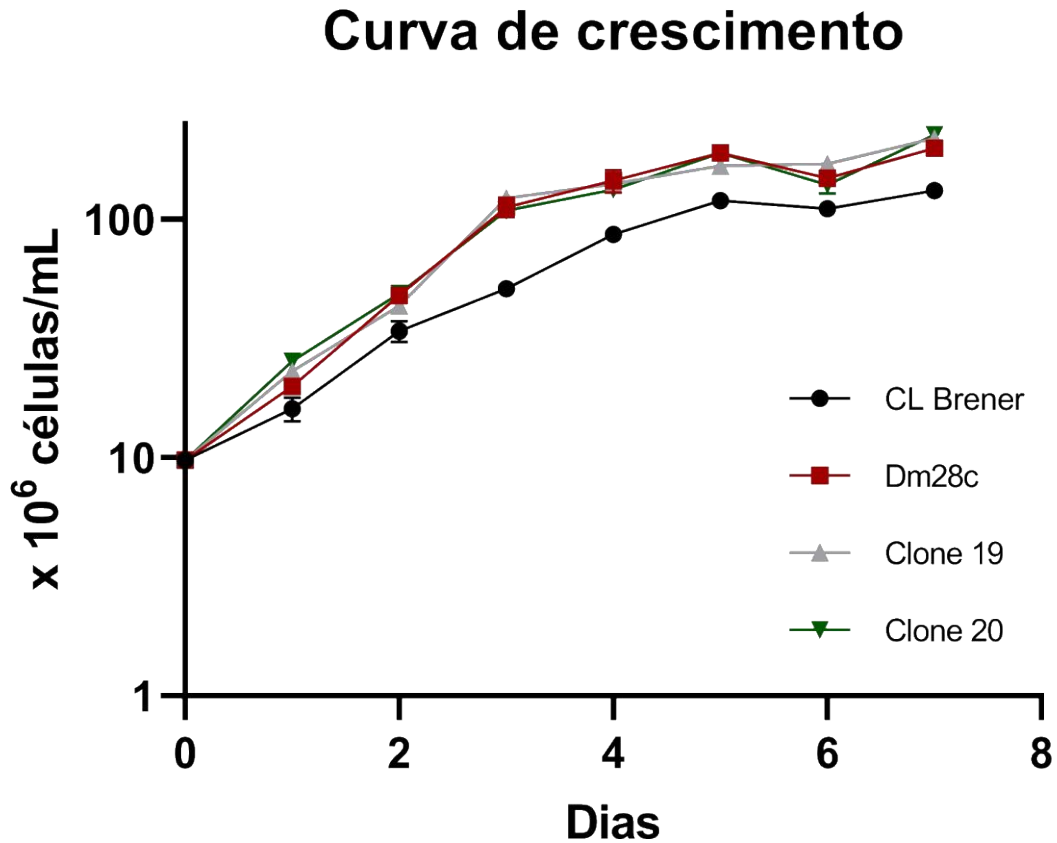
parental Dm28c, possuindo três fragmentos para o gene COII, (30, 81 e 264pb) e um fragmento de 110pb para o gene rDNA 24S $\alpha$  (Fig. 19).



**Figura 19:** Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio. As amostras analisadas de acordo com os primers COII e rDNA 24S $\alpha$ . Para ambos os marcadores utilizados os clones demonstraram maior semelhança à Dm28c.

### 5.8 O crescimento dos clones é semelhante ao de Dm28c, quando em condições normais

Com o intuito de caracterizar fenotípicamente os clones 19 e 20 (CL Brener wt + Dm28c wt) e observar se o processo de hibridização interfere em seu crescimento, foi realizado diversas curvas de crescimento em condições normais. Como o esperado, o comportamento de ambos os clones é semelhante à Dm28c, apresentando crescimento mais acelerado que a cepa CL Brener. No gráfico, é possível notar muitos pontos sobrepostos entre Dm28c, clone 19 e 20 (Fig. 20).

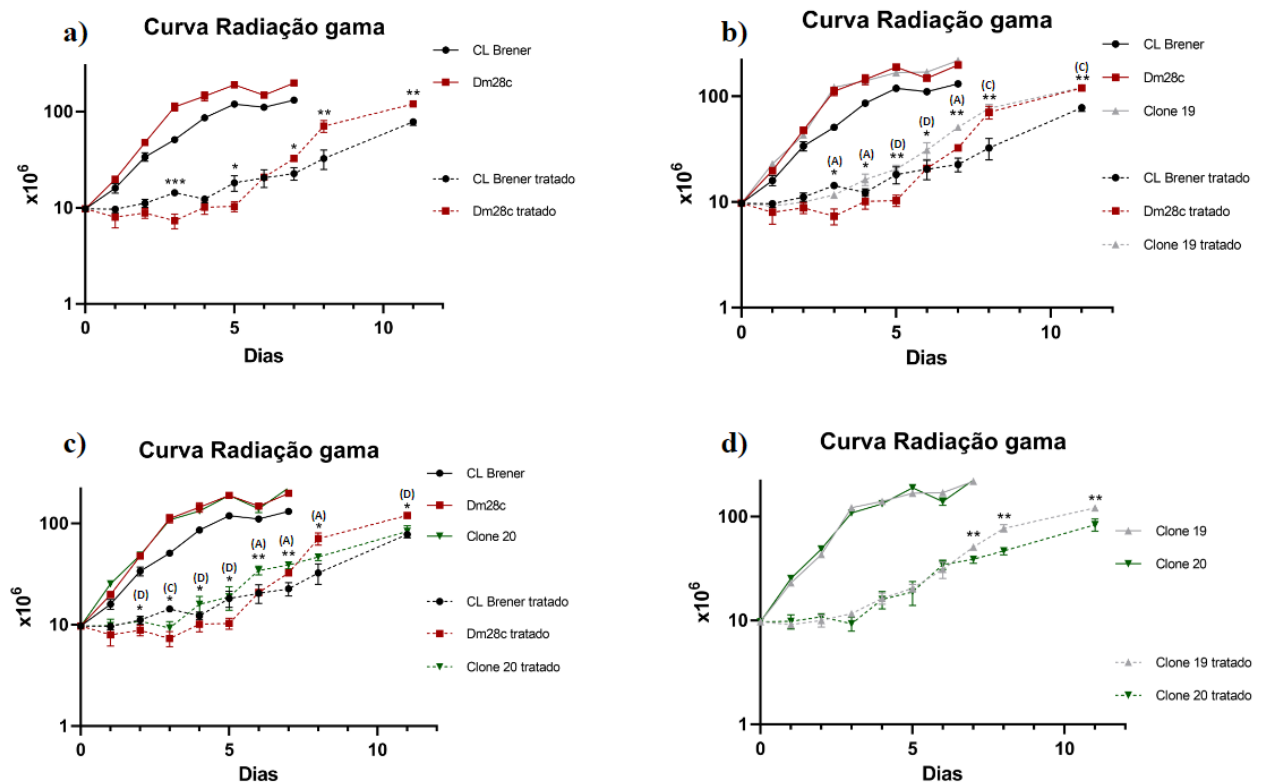


**Figura 20:** Curva de crescimento de células de *T. cruzi* selvagens e clones 19 e 20, irradiadas sob condições normais. Os clones 19 e 20 apresentam um crescimento superior à cepa CL Brener e um crescimento semelhante à cepa Dm28c.

#### **5.9 O crescimento dos clones é semelhante ao de CL Brener, quando irradiados com radiação gama**

Também investigamos o perfil de crescimento dos clones 19 e 20 após dano ao DNA, induzido por uma carga de 500Gy de radiação gama. Para tanto utilizamos meio filtrado, que se mostrou importante para a melhor investigação das condições de crescimento das células após dano.

Curiosamente observamos que diferente do perfil de crescimento em condições normais, onde os clones 19 e 20 demonstraram crescimento semelhante ao provável parental Dm28c, sob condições de estresse os clones se assemelham ao crescimento de CL Brener. Nota-se que a partir do quarto dia após a irradiação os clones 19 e 20 iniciam a retomada do crescimento, comportamento já observado pelo nosso grupo em CL Brener (Fig. 21 b e c).

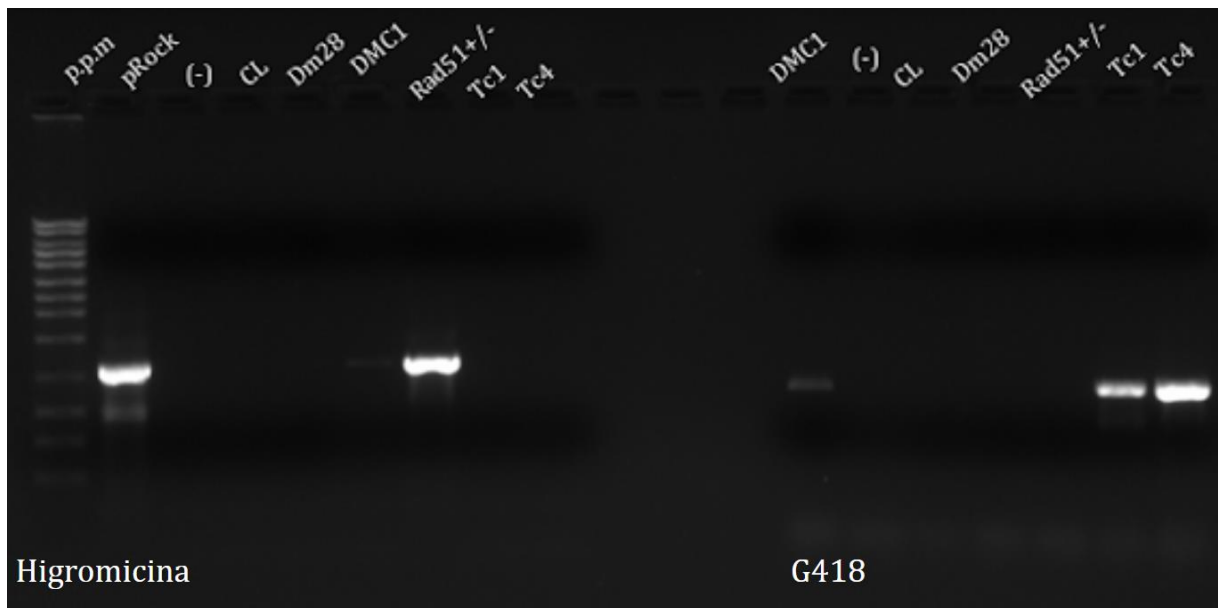


**Figura 21: Curva de crescimento de células de *T. cruzi* selvagens e clones 19 e 20 em condições normais e pós irradiação. a)** Curva de crescimento após radiação gama das células CL Brener e Dm28c. **b)** Curva de crescimento após radiação gama das células CL Brener e Dm28c e clone 19. **c)** Curva de crescimento após radiação gama das células CL Brener e Dm28c e clone 20. **d)** Curva de crescimento após radiação gama dos clones 19 e 20. (A) Diferença estatística dos clones para ambos os parentais, CL Brener e Dm28c. (C) Diferença estatística entre clones e CL Brener. (D) Diferença estatística entre clones e Dm28c. \*Valor de  $p < 0,05$

### 5.10 Células de Dm28c selvagens são viáveis em meio de cultivo contendo higromicina®

O mesmo experimento de hibridização e seleção de clones por sorting, descrito acima, foi realizado com células geneticamente modificadas com diferentes resistência a antibióticos, CL Brener heminocaute para Rad51 (resistente a higromicina®) e Dm28c superexpressor de DMC1 (resistente a G418®). As células duplo marcadas isoladas por FACS foram cultivadas em meio LIT fresco contendo ambos antibióticos, para a seleção. Diferente dos clones oriundos de CL Brener e Dm28c selvagens (clones 19 e 20), os clones advindos da mistura entre as células geneticamente modificadas (clones 1 e 4) não conseguiram crescer em meio autoclavado, sendo necessário manter seu cultivo em meio LIT fresco filtrado.

Após o crescimento dos clones 1 e 4, foi realizada a extração de DNA, que posteriormente foi utilizado em uma PCR convencional para amplificação de ambos genes de resistência, porém, foi observado amplificação apenas do gene de G418® (804pb) (Fig. 22).



**Figura 22: Gel de agarose corado com brometo de etídio.** Clones Tc1 e Tc4 amplificaram o gene de resistência a G418®, mas não amplificaram para o gene de resistência à higromicina®.

Após esse resultado, ambos os clones e os parentais selvagens CL Brener e Dm28c foram cultivados em meio fresco contendo higromicina®, pelo período de 4 semanas. A cepa Dm28c selvagem foi resistente à higromicina® e sua população cresceu normalmente após as



4 semanas. Porém, CL Brener não foi capaz de crescer em meio com o antibiótico, assim como a mistura realizada com CL Brener e Dm28c, cultivados juntos (Tabela 4).

**Tabela 3** - Tabela com o resultado da sobrevivência de diferentes cepas de *T. cruzi* após 30 dias de cultivo em antibiótico higromicina®. (-) Células mortas após 4 semanas (+) Células sobreviventes após 4 semanas.

CL Brener wt	Dm28c wt	CL Brener + Dm28c wt	Clone 1	Clone 4
-	+	-	+	+

## 6. DISCUSSÃO

Inicialmente foi proposto que *T. cruzi* era um organismo clonal cuja reprodução era estritamente assexuada, porém este tipo de reprodução não suporta a existência de diversos fenótipos observados na estrutura populacional do parasito. Dados mais recentes demonstraram a ocorrência de ao menos dois eventos de hibridização entre grupos TcII e TcIII na história evolutiva de *T. cruzi* e a existência de grupos híbridos, como TcV e TcVI demonstram a ocorrência de troca genética entre esses organismos (Tibayrenc 1998; Pedroso et al. 2003; Sturm *et al.*, 2003).

O primeiro estudo *in vivo* capaz de comprovar a ocorrência de eventos de hibridização em *T. cruzi* foi realizado por Gaunt e colaboradores (2003), que demonstraram que mecanismo de troca genética em *T. cruzi* é um evento incomum e diferente do mecanismo proposto para, *Trypanosoma brucei*. Os experimentos foram realizados utilizando culturas de células de mamífero (VERO) e clones de *T. cruzi* foram transfectados para carregar diferentes marcadores de resistência de a antibióticos (P1-hig e P2-neo). Os parasitos transfectados foram passados juntos por todo o ciclo de vida, sendo possível ao final isolar seis clones resistentes a ambos os marcadores, que demonstraram a ocorrência de fusão de genótipos parentais, perda de alelos, recombinação homóloga e herança uniparental do DNA do maxicírculo.

Depois deste, outros estudos utilizando diferentes metodologias demonstraram *in vitro* o evento de hibridização em *T. cruzi*, como os trabalhos realizados por Repolês, 2019 que utilizou análogos de timidina para mostrar a ocorrência de um genoma híbrido, e os de Resende, 2019 e Silva, 2022, que utilizaram marcadores de proliferação celular que marcam o citoplasma das células, demonstrando o processo de fusão celular nestes organismos. No trabalho aqui realizado, nós utilizamos a técnica de marcação do citoplasma para investigar a taxa de formação de híbridos de *T. cruzi* em diferentes DTUs e em cepas modificadas em genes de recombinação em condições normais e após tratamento com radiação gama.

Com a realização deste trabalho foi possível observar que o evento de hibridização em *T. cruzi* não é constante e fácil de documentar. A periodicidade do evento de reprodução sexual do parasito ainda não foi elucidada, mas, ao que tudo indica, há um complexo mecanismo regulatório. Observamos que ao longo do tempo a cepa CL Brener apresentou uma redução acentuada na formação de células híbridas. O trabalho realizado por Resende (2019), mostrou uma taxa de 7% de híbridos de CL Brener em uma contagem total de 100 células. Em

contrapartida, no presente estudo o máximo encontrado de híbridos foi 5,04% em uma contagem de 200 células.

A média da porcentagem de híbridos para todos os ensaios de fusão citoplasmática realizadas com misturas da cepa CL Brener selvagem (CL x CL) é de 0,9%. Apesar de o dado não estar de acordo com os achados de Resende (2019), eles se encontram próximos dos resultados de Silva (2022), que realizou ensaios de fusão citoplasmática entre células selvagens de CL Brener (CL x CL) e encontrou uma média de aproximadamente 0,12%. Apesar da média geral ser baixa, CL Brener demonstrou uma maior capacidade de fusão citoplasmática que outras cepas, quando analisadas em contagem manual de 200 células. Em misturas de Dm28c selvagem tratadas independentemente não foi possível encontrar células duplo marcadas utilizando a técnica de microscopia de fluorescência. Porém, ao utilizar o citômetro foram encontrados 15 eventos de células duplo marcadas, em um total de 10 mil eventos (0,2%), o que demonstra, mais uma vez, a raridade da hibridização em *T. cruzi*.

Deve-se ressaltar também que o mesmo experimento de citometria de fluxo foi realizada com a cepa CL Brener, em dois momentos diferentes, sendo encontrado apenas 5 eventos de células duplo marcadas, em 10 mil, o que gera uma quantidade insuficiente de eventos para se estabelecer uma porcentagem, no primeiro experimento e 19 eventos de células duplo marcadas em 20 mil eventos totais, quantificando 0,1% no segundo experimento. Uma hipótese levantada por nosso grupo para a diminuição na porcentagem de híbridos formados por misturas de CL Brener é a nutrição. Em Fungos unicelulares de reprodução predominantemente assexual, mas com capacidade de reprodução sexual, já foi observado a presença de genes regulatórios que são ativos em condições de estresse e desnutrição. Em *T. cruzi*, o contrário parece acontecer, já que em meio autoclavado (com menor disponibilidade de glicose e nutrientes) observou-se uma tendência de diminuição de híbridos, enquanto o cultivo em meio de cultura filtrado (maior disponibilidade de glicose e nutrientes) foi capaz de restaurar o processo de hibridização. Alves, 2018 demonstrou que a recombinase Rad51 possui um papel fundamental no processo de troca genética em *T. cruzi*, e sabendo que ela é uma recombinase dependente de ATP, pode-se sugerir que o custo energético do processo de hibridização demande de *T. cruzi* uma quantidade maior de glicose e nutrientes para suprir as necessidades do processo (Souza, Silva e Ferreira, 2003; Lin *et al.*, 2006; Bell e Kowalczykowski, 2016).

Já foi descrito em diversos trabalhos que a escolha de entrar ou não em um ciclo sexual depende de fatores externos, bem como de regulações internas de proteínas necessárias para o

processo. O maior desafio, então, é conseguir identificar quais fatores ambientais podem influenciar este fenômeno raro em *T. cruzi* e como ocorre a sinalização e regulação desse processo, bem como identificar todas as proteínas envolvidas. Uma descoberta interessante é que células naturalmente híbridas, como CL Brener (TcVI) e Bug2419 (TcV) expressam mais proteínas Rad51 do que células não híbridas. Utilizando análogos de timidina, Alves e colaboradores (2018), estudaram a formação de híbridos em células de CL Brener superexpressora de Rad51. Foi observado um aumento de 10% na quantidade de híbridos em células superexpressando RAD51, quando comparada a células selvagens (Souza, Silva e Ferreira, 2003; Alves, *et al.*, 2018). Porém, ao realizar um ensaio de fusão citoplasmática com o marcador de proliferação celular (CellTrace) nós observamos uma redução na quantidade de híbridos na mistura de Super expressor de Rad51 (CL Brener) com CL Brener selvagem, em relação ao controle (mistura contendo apenas CL x CL).

Também utilizamos uma cepa não híbrida superexpressora de Rad51 (Dm28c) no ensaio de fusão citoplasmática. Apesar de não termos observado células fundidas na mistura controle, contendo apenas Dm28c selvagens (Dm28c x Dm28c), foi possível encontrar células fundidas na mistura contendo células de Dm28c superexpressor de Rad51 (Fig. 9). Uma possível explicação para isso é que os níveis mais altos de Rad51 em Dm28c influenciaram para que mais eventos de recombinação ocorresse nessa cepa.

O fato de não termos vislumbramos o mesmo efeito relatado acima na cepa de CL Brener superexpressora de Rad51, pode ser influência de uma quantidade inadequada de glicose para sustentar uma maior quantidade de eventos de hibridização induzidos por Rad51. Deve-se lembrar que CL Brener naturalmente já possui níveis mais elevados dessa proteína e a indução de uma superexpressão talvez exija uma maior demanda nutricional e energética para o funcionamento adequado do processo de recombinação envolvido com a troca genética. Por Dm28c selvagem possuir menor nível de Rad51, pode-se cogitar que a quantidade expressa após a modificação da célula não foi o suficiente para uma alta demanda energética, aproximando o fenótipo de hibridização das células modificadas com o de CL Brener selvagem (Resende, 2019).

O fato de células de CL Brener heminocautas para o gene de Rad51 demonstrarem a menor taxa de híbridos entre as misturas realizadas com células modificadas para Rad51, e também uma taxa menor quando comparado ao controle selvagem (CL x CL), corrobora com a hipótese de que Rad51 exerce uma função primordial no processo de hibridização de *T. cruzi* (Fig. 9). Não

se sabe, porém, se a diminuição nos níveis de hibridização exercem esse feito interferindo no processo inicial de hibridização de *T. cruzi* ou se a diminuição dessa proteína prejudica a estabilidade genômica dos híbridos, diminuindo a viabilidade das células fusionadas (Alves, *et al.*, 2018).

Estudos filogenéticos indicaram que no início da evolução dos eucariotos o gene RadA, pertencente a archeas, sofreu um processo de duplicação que originou os genes Rad51 e DMC1 nos eucariotos atuais. A julgar pelo fato de DMC1 atuar especificamente na recombinação meiótica, pode-se presumir que talvez o fato de um organismo apresentar DMC1 em seu genoma implique na capacidade de realizar trocas genéticas via meiose. O fato de existirem trabalhos relatando a atividade de DMC1 em eventos de trocas genéticas em eucariotos unicelulares como amebas, *Plasmodium* e *Trypanosomas* reforça ainda mais a ideia de que possa ocorrer eventos meióticos em organismos que expressam DMC1, mesmo que em menor grau (Lin, *et al.*, 2006; Milambo, Coppens e Kumar, 2012; Kelso *et al.*, 2015; Tabbabi *et al.*, 2020; Telittchenko e Descoteaux, 2020; Peacock *et al.*, 2011, 2014 e 2021). Por isso, decidimos investigar se a superexpressão dessa proteína influencia no aumento da hibridização em *T. cruzi*. Foi observado que a diferença entre a mistura contendo CL Brener selvagem e Dm28c superexpressor de DMC1 foi mínima, sendo encontrado apenas uma célula fundida em três ensaios realizados.

Tanto eventos de reprodução parassexual, quanto eventos de reprodução meiótica já foram relatados na literatura, envolvendo *T. cruzi*. Um estudo de genética de populações estimou a frequência da meiose em grupos de *T. cruzi*, no Equador. Após análise de 45 clones biológicos, o grupo chegou à conclusão de que a meiose realmente ocorre nesses parasitos. Um outro trabalho mostrou *in vitro* um evento de hibridização, onde os genomas parentais se fundiram gerando células tetraplóides que mais tarde sofreram “erosão” do DNA. Esse processo de fusão pode ser considerado um evento de parassexualidade, como já é bem descrito em fungos. Os dados sugerem também a possibilidade de Rad51 e DMC1 atuarem em mecanismos recombinacional diferentes, estando Rad51 possivelmente envolvida em trocas genéticas não meióticas, enquanto DMC1 atua numa via meiótica. O fato da superexpressão de DMC1 não aumentar os níveis de hibridização pode ser um indicativo de que em *T. cruzi* o processo de reprodução parassexual seja mais frequente *in vitro* do que a reprodução meiótica (Gaunt, *et al.*, 2003; Bennet e Johnson, 2003; Berry *et al.*, 2019; Schwabl *et al.*, 2018 e 2019).

A desnutrição pode ser considerada um ponto-chave na ativação da reprodução sexuada em alguns organismos eucariotos unicelulares como fungos. Estudos demonstraram que em *Saccharomyces cerevisiae*, a falta de recursos nutricionais resulta em um aumento da taxa de recombinação. Até mesmo em *Drosophila* já foi observado que a deficiência nutricional é um estímulo para o aumento da taxa de recombinação. Porém, o mesmo parece não se aplicar em *T. cruzi*, onde demonstramos que o cultivo em meio mais rico (filtrado) favoreceu os eventos de hibridização na mistura realizada com CL Brener e Dm28c selvagens (Fig.12). Não há na literatura dados que corroboram com nossos achados, nem estudos investigando o papel da nutrição no processo de hibridização em tripanossomatídeos. Porém, podemos sugerir que a nutrição enriquecida proporcione mais aminoácidos e glicose necessários para o processo de recombinação, já que algumas enzimas envolvidas no processo (como a Rad51) são dependentes de ATP (Levine, 1955; Abdullah e Borts, 2001; Souza, Silva e Ferreira, 2003; Lin *et al.*, 2006). Porém, para confirmar se a nutrição tem influência no processo de recombinação é necessário a realização de uma qPCR para os genes envolvidos na HR e reprodução sexual, como Rad51, DMC1, HOP1 e HAP2 com os parasitos sendo cultivados tanto em meio autoclavado (menos rico) quanto em meio filtrado (mais rico).

Uma informação interessante é que *T. cruzi* possui a proteína transmembrana de fusão HAP2 que é expressa em gametas. Já foi demonstrado que esta proteína é expressa em células competentes ao acasalamento em *Leishmania*, o que a elege como provável marcador de células híbridas. Por isso, é impossível não pensar no papel que HAP2 possa exercer em *T. cruzi*, como a capacidade desses parasitos de formar gametas, quais os mecanismos de regulação desse gene, se há um mecanismo de sinalização que leva a célula a aumentar a produção dessas proteínas transmembranas, indicando o momento certo para a reprodução sexual (Fedry, *et al.*, 2018; Louradour *et al.*, 2021).

Em *T. brucei* já foi comprovado a existência de reprodução sexual e estudos vêm indicando uma provável capacidade desses parasitos formar gametas. Peacock e colaboradores observaram que células epimastigotas diplóides de *T. brucei* tornam-se haplóides quando ocorre o aumento da expressão de genes de meiose, como HOP1, DMC1 e MND1. Foi observado que as células passam por eventos de meiose, e posteriormente o grupo conseguiu distinguir estágios intermediários na formação de gametas desse parasito. Estudos realizados com *Leishmania* também demonstraram a presença do gene HAP2 em células com a capacidade de se fundir, indicando que HAP2 pode ser considerado um marcador de células com capacidade de formar híbridos (Peacock, *et al.*, 2011, 2014 e 2021; Louradour *et al.*, 2021). HAP2 é uma proteína

altamente conservada e já foi demonstrado que ela é homóloga às proteínas virais de fusão de classe II, que tem a função de iniciar a fusão do vírus com células hospedeiras. Isso sugere que ela surgiu no início da evolução dos eucariotos, o que abre espaço para nos questionarmos se a expressão de genes de recombinação meióticos, como DMC1 poderia estar regulando a expressão desse gene em *T. cruzi* (Clark, 2018; Fedry, *et al.*, 2018).

Levando em conta que hipóteses acerca do surgimento da reprodução sexuada diz que ela teria se originado de mecanismos de reparo de DNA, sendo utilizada para reparar danos oxidativos em células primitivas, em um processo que utilizava DNA homólogo não lesionado como um molde para o reparo do DNA lesionado, testamos se DSBs seriam um estímulo favorável ao evento de hibridização em *T. cruzi*. Para isso, tratamos populações isoladas de diferentes DTUs com 500 Gy de radiação gama e os utilizamos para realizar o ensaio de fusão citoplasmática (Bernstein, Hopf, Michod, 1989 ; Hörandl e Hadacek, 2013).

Foram coletados dois pontos, 4 e 24 horas após a irradiação das células. Também realizamos o ensaio com células não irradiadas, mas que passaram por toda a etapa de transporte que as células irradiadas. Os resultados obtidos não foram conclusivos, demonstrando mais uma vez a dificuldade de mapear os eventos de hibridização em *T. cruzi*. A mistura contendo apenas Dm28c (Fig. 15) apresentou híbridos 4 horas após a irradiação das células a 500 Gy em duas das três triplicatas realizadas. Porém, não se pode afirmar que isso é devido ao tratamento com a radiação ou se é devido a mudança de meio, do autoclavado para o filtrado. Já foi demonstrado na literatura que a radiação gama afeta a expressão gênica nestes parasitos de maneira dependente do tempo, e 4 horas após o tratamento com radiação gama é quando se tem os níveis mais altos da recombinase Rad51. Caso todas as misturas apresentassem esse padrão de aumento de eventos de híbridos após 4 horas de tratamento, seria interessante quantificar os níveis de RNA dos genes Rad51, DMC1 e HAP2. Mas o fato de misturas de CL Brener, e CL Brener com Dm28c não apresentarem células híbridas em 4 horas demonstra que provavelmente o evento observado se deu ao acaso (Grynberg, *et al.*, 2012).

Esse padrão encontrado difere de dados da literatura encontrados no trabalho de Louradour e colaboradores (2022) onde células promastigotas de *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* foram expostas à radiação gama, aumentando a quantidade de híbridos *in vitro*. Isso nos leva a questionar se para *T. cruzi* o estímulo para a fusão de células é diferente do estímulo para *Leishmania*. Outra diferença entre os experimentos é que as células de *Leishmania* foram irradiadas com apenas 6 Gy de radiação gama. Um

experimento interessante seria testar diferentes doses de radiação nos parasitos e ver se dosagens mais baixas seriam o ideal para induzir a formação de células híbridas.

Na natureza, *T. cruzi* fica expostos a espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode levar seu DNA a sofrer dano oxidativo. Sabendo da importância desse tipo de dano para a história evolutiva da reprodução sexual, é válido testar se o estresse oxidativo pode influenciar de alguma maneira nos eventos de hibridização (Nedelcu e Michod, 2003).

Quando realizado o ensaio de fusão citoplasmática utilizando o FACs, tivemos uma taxa de híbridos de 0,1% em misturas de CL Brener e 0% em misturas de CL Brener com Dm28c (Fig. 7 e 11). Porém, mesmo com uma porcentagem tão baixa foi possível selecionar células híbridas advindas dos poucos eventos de células duplo marcadas encontradas. Clones de ambas as misturas foram isolados e cultivados em meio LIT fresco. Dois destes clones resultantes da mistura de CL Brener e Dm28c (19 e 20), foram escolhidos para a genotipagem e ensaios fenotípicos, devido ao fato das cepas serem de DTUs diferentes, possibilitando a análise genotípica por meio de PCR. Foram utilizados primers para dois marcadores, COII, um marcador mitocondrial e rDNA 24 S $\alpha$ , um marcador nuclear. A cepa CL Brener, é um híbrido natural pertencente a DTU TcVI, tem um perfil de genotipagem diferente de Dm28c, sendo observado dois fragmentos de DNA no gel de poliacrilamida 6% nos tamanhos 81 e 294pb para o marcador COII e um fragmento de 125pb para o marcador rDNA 24 S $\alpha$ . Já em Dm28c (TcI) é possível visualizar três fragmentos no gel, de 30, 81 e 264pb para o marcador COII e um fragmento de 110pb para o marcador rDNA 24 S $\alpha$ .

Ao genotipar os clones, observamos um perfil mais semelhante ao de Dm28c, com 3 fragmentos do tamanho aproximado de 30, 81 e 264pb para o marcador mitocondrial e 110pb para o nuclear. Paranaíba, 2019, tentou selecionar híbridos de *Trypanosoma cruzi* utilizando linhagens fluorescentes que expressam as proteínas GFP (verde) e RFP (vermelha) em clones YuYu e Bug, respectivamente. Os parasitos foram utilizados para infectar o vetor *Triatoma infestans*. Após 28 dias os excrementos do vetor foram coletados e semeados em meio LIT fresco contendo dois antibióticos de seleção, G418® e Higromicina B®. Foi possível selecionar parasitos resistente a ambos os antibióticos em uma das amostras coletadas, porém, após genotipagem utilizando os mesmos marcadores utilizados neste trabalho, COII e rDNA 24 S $\alpha$ , foi observado que a população era idêntica ao parental Bug.

Kay e colaboradores (2022) sequenciaram híbridos originados do cruzamento de *Trypanosoma brucei brucei* J10 e 1738. O grupo observou que ocorre uma mistura de



cromossomos de ambos os parentais, e também uma mistura de DNA do cinetoplasto na região do minicírculo. Porém, o maxicírculo é herdado de apenas um dos parentais. Gaunt e colaboradores (2003) também observou em seus achados que a herança do DNA do maxicírculo é uniparental. Como o marcador mitocondrial que utilizamos é o COII, gene que está localizado no genoma mitocondrial na região do maxicírculo, podemos inferir que o mesmo possa ter ocorrido com os clones que isolamos. Utilizando apenas os dois marcadores, COII e rDNA 24 Sa não temos evidências o suficiente para confirmar se os clones 19 são híbridos e nem que não são, já que é totalmente possível que o conteúdo de seu minicírculo e outros marcadores nucleares sejam semelhantes aos de CL Brener. Por isso, a melhor maneira de confirmar se os clones selecionados são realmente híbridos é por meio do sequenciamento de DNA.

O primeiro teste realizado a fim de detectar alterações fenotípicas nos clones, foi a curva de crescimento. Por já sabermos que os marcadores genotípicos dos mesmo é semelhante à Dm28c, não foi surpresa observar que o perfil de crescimento também é.

A radiação gama consegue modificar a permeabilidade da membrana celular, seja por meio direto ou por influência dos radicais livres que são gerados com a exposição à seus raios. Outras consequências desse tipo de radiação são alteração da estrutura e função de proteínas e também dano ao DNA. As lesões causadas por esse agente são graves e podem variar desde a oxidação de bases e formação de sítios AP (Sítios Apurínicos ou Apirimidínicos) até quebras de fita dupla. Outra preocupação, é que vários dos danos gerados pela radiação gama geram DSBs, como uma estrutura intermediária do reparo, aumentando ainda mais este tipo de dano após a irradiação, o que se torna um desafio para os mecanismos de reparo de DNA da célula, podendo causar a instabilidade genômica (Sage e Shikazono, 2017; Harrell *et al*, 2018).

Levando isso em consideração, foi interessante submeter os clones 19 e 20 à radiação gama, para verificar a maneira como essas células lidariam com esses desafios. Para isso, tanto os clones quanto os parasitos selvagens foram expostos a 500 Gy de radiação gama. Após a irradiação, observamos que todas as células irradiadas pararam o crescimento por duas semanas, em comparação com os parasitos não expostos à radiação gama (Fig. 19). Porém, diferente dos dados encontrados na literatura, as células selvagens CL Brener e Dm28c não retomaram o crescimento no tempo esperado (Resende, 2019). Ao invés de retornarem o crescimento normalmente após alguns dias, as células selvagens apresentaram um crescimento lento e quase contínuo, na curva.

Como a cepa CL Brener já vinha apresentando dificuldade em duplicar, decidimos testar se o meio de cultura era o responsável pelas alterações apresentadas. Durante 2 semanas todos os parasitos utilizados no experimento foram cultivados em meio LIT fresco filtrado, fornecendo maior quantidade de nutrientes e glicose a eles. Posteriormente, repetimos o experimento e observamos que as células voltaram a apresentar o perfil esperado. Podemos especular que devido ao longo período de cultivo em meio autoclavado, alguns genes envolvidos na HR podem ter diminuído sua expressão devido a uma menor disponibilidade de nutrientes e glicose, o que afetou não somente o perfil de crescimento após submissão a radiação gama (Fig. 19), quanto o perfil de formação de híbridos (Fig. 12).

Ao analisar o crescimento dos clones 19 e 20 após tratamento com 500 Gy de radiação gama observamos que, apesar da genotipagem e da curva de crescimento mostrarem que o perfil genotípico e fenotípico dos clones (em condições normais) ser semelhante à cepa Dm28c, ao ser irradiado as células passaram a apresentar um comportamento parecido com CL Brener. Enquanto as células de Dm28c irradiadas demoraram cerca de 5 dias para retomar a capacidade de crescer, os clones 19 e 20 levam cerca de 3 dias, um perfil muito semelhante à CL Brener selvagem. Já foi demonstrado que CL Brener, assim como outras cepas naturalmente híbridas (TcVI e TcV) possuem níveis de expressão de Rad51 mais altos que as demais cepas não híbridas (Resende, 2019). Podemos inferir que os clones 19 e 20 talvez tenham herdado essa característica de CL Brener, em caso de confirmação da hipótese dessas células serem híbridas. Um experimento importante de ser realizado é a qPCR de Rad51 dos clones e ambos os selvagens utilizados na mistura, para verificar com qual célula selvagem os clones possuem mais semelhança nesse quesito. E claro, cada vez mais fica evidente a importância da realização do sequenciamento total dessas células, pois esta será a forma mais eficiente e confiável de confirmar se os clones 19 e 20 são de fato híbridos.

Também foi documentado neste trabalho a tentativa de selecionar híbridos advindos da mistura de duas populações geneticamente modificadas com diferentes marcadores antibióticos. Porém, nossos dados sugerem que a mistura possivelmente não é híbrido, já que foi observado, após a seleção, que o parental selvagem que foi utilizado para a realização da célula modificada (Dm28c que deu origem ao superexpressor de DMC1 resistente a G148) possui resistência ao antibiótico Higromicina®. Um outro trabalho realizado com as cepas YuYu e Bug marcadas independentemente com Higromicina® e G148® obteve um resultado semelhante ao nosso. Foi selecionado um clone capaz de viver em meio contendo ambos os antibióticos, mas o resultado das genotipagens demonstrou que o clone não era híbrido, mas

sim que a cepa Bug possivelmente possui capacidade de resistir ao meio cultivado com higromicina®. Uma hipótese que talvez pudesse explicar essa resistência seria a contaminação cruzada de culturas, porém, a PCR mostrou que Dm28c não possui o gene de resistência a Higrimicina® que é utilizada nas células geneticamente modificadas.

## 7. CONCLUSÃO

Este trabalho nos forneceu dados importantes sobre o evento de hibridização em *Trypanosoma cruzi* realizados *in-vitro*. Apesar de raro, várias evidências têm demonstrado que existe um sistema de reprodução sexual nesses parasitos, porém, não se sabe ainda como este evento é regulado, quais as proteínas envolvidas e quais os gatilhos para a sua ocorrência. Ao se tratar de hibridização, há um enorme campo de estudos com diversas perguntas a serem respondidas: quais as formas do parasitos que podem hibridizar, qual frequência deste evento na natureza, qual o papel da reprodução sexual na história evolutiva destes parasitos, quais as implicações disso para a saúde humana e o quanto este mecanismo está relacionado com o reparo de DNA, dentre outros diversos questionamentos.

## 8. PERSPECTIVAS

Para o melhor entendimento do evento de hibridização de *T. cruzi*, pretende-se sequenciar o genoma dos supostos híbridos, bem como o de seus parentais. Também almeja-se continuar com a caracterização dessas células, analisando suas respostas a outros agentes genotóxicos, se estas células mantêm a capacidade de invasão, e se elas possuem a capacidade de se fundir.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADL, S. M. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.
2. ALVES, C. L. et al. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
3. AULD, S KJR, Shona K. Tinkler, and Matthew C. Tinsley. Sex as a strategy against rapidly evolving parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016.
4. BABIKER, H.A.; WALLIKER, D.. Current views on the population structure of *plasmodium falciparum*: implications for control. **Parasitology Today**, [S.L.], v. 13, n.7, p. 262-267, jul. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4758\(97\)01075-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01075-2).
5. BATIPSTA, R. D. P. et al. *Infection*, Genetics and Evolution Evidence of substantial recombination among *Trypanosoma cruzi* II strains from Minas Gerais. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 183–191, 2014
6. BAJINSKIS, A., NATARAJAN, A. T., ERIXON, K., AND HARMS-RINGDAHL, M. DNA double strand breaks induced by the indirect effect of radiation are more efficiently repaired by nonhomologous end joining compared to homologous recombination repair. **Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen**. 2013
7. BENGTON, STEFAN, et al. "Three-dimensional preservation of cellular and subcellular structures suggests 1.6 billion-year-old crown-group red algae." **PLoS Biology** 15.3 (2017): e2000735.
8. BERN, CARYN. "Chagas' disease." *New England Journal of Medicine* 373.5 (2015): 456-466.
9. BERNSTEIN, HARRIS, GREGORY S. BYERS, AND RICHARD E. MICHOD. "Evolution of sexual reproduction: importance of DNA repair, complementation, and variation." **The American Naturalist** 117.4 (1981): 537-549.
10. BERNSTEIN H, BERNSTEIN C; BERNSTEIN (2010). "Evolutionary origin of recombination during meiosis". **BioScience** 60 (7): 498–505.

11. BERNSTEIN, C.; JOHNS, V. Sexual reproduction as a response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 4, p. 1893–1897, 1989.
12. BERRY, A. S. F. et al. Sexual reproduction in a natural *trypanosoma cruzi* population. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. 1–17, 2019.
13. BISHOP, D. K. et al. DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. **Cell**, v. 69, n. 3, p. 439–456, 1992.
14. BLAIR, HEDGES S., et al. "A genomic timescale for the origin of eukaryotes." (2001).
15. BOCQUET, NICOLAS, et al. "Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by topoisomerase III $\alpha$  and RMI1." **Nature structural & molecular biology** 21.3 (2014): 261-268.
16. BOSCH, M. VAN DEN; BREE, R. T.; LOWNDES, N. F. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. **EMBO Reports**, v. 4, n. 9, 2003
17. BOSSENO, MARIE-FRANCE, et al. "Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 95.5 (2000): 601-607.
18. BRISSE, SYLVAIN, et al. "A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting." **Molecular and biochemical parasitology** 92.2 (1998): 253-263.
19. BUCKNER, FREDERICK S. "The Tryp and the Pendulum." **EBioMedicine** 64 (2021).
20. CASARI, ERIKA, et al. "To Fix or Not to Fix: Maintenance of Chromosome Ends Versus Repair of DNA Double-Strand Breaks." **Cells** 11.20 (2022): 3224.
21. CAVALIER-SMITH, THOMAS. "A revised six-kingdom system of life." **Biological Reviews** 73.3 (1998): 203-266.
22. CHAGAS CJR. 1908. *Trypanosoma minasense*. **Brazil-Médico** 48 – ano XXII.

23. CHAGAS CRJ. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1: 159-218.
24. Clark T. HAP2/GCS1: Mounting evidence of our true biological EVE? **PLoS Biol.** 2018 Aug 20;16(8):e3000007
25. COMINETTI, M.C., CSORDAS, B.G., CUNHA, R.C. AND ANDREOTTI, R., 2014. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 47, pp.747-755.
26. ELBAKRY, AMIRA, E MARKUS LÖBRICH. "Homologous Recombination Subpathways: A Tangle to Resolve." **Frontiers in Genetics** 12 (2021): 723847.
27. ENGELSTÄDTER, JAN. "Asexual but not clonal: evolutionary processes in automictic populations." **Genetics** 206.2 (2017): 993-1009.
28. FÉDRY, JULIETTE, YANJIE LIU, GÉRARD PÉHAU-ARNAUDET, JIMIN PEI, WENHAO LI, M. ALEJANDRA TORTORICI, FRANÇOIS TRAINCARD et al. "The ancient gamete fusogen HAP2 is a eukaryotic class II fusion protein." **Cell** 168, no. 5 (2017): 904-915.
29. FRANZEN, O., OCHAYA, S., SHERWOOD, E., LEWIS, M. D., LLEWELLYN, M. S., MILES, M. A., & ANDERSSON, B. (2011). Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS neglected tropical diseases**, 5(3), e984.
30. FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONÇALVES VF, TEIXEIRA SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD 2006. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi* **PLoS Pathog** 2: e24.
31. GAUNT, M. W., YEO, M., FRAME, J. A., STOTHARD, J. R., CARRASCO, H. J., TAYLOR, M. C., et al. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**. doi:10.1038/nature01438.
32. GOMES PASSOS SILVA, D., DA SILVA SANTOS, S., NARDELLI, S. C., MENDES, I. C., FREIRE, A. C. G., REPOLÊS, B. M., et al. (2018). The in vivo and in vitro

roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 12:e0006875. doi: 10.1371/journal.pntd.0006875

33. GLOVER, L., JUN, J., AND HORN, D. (2011). Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. **Nucleic Acids Res.** doi:10.1093/nar/gkq981
34. GRAY, MICHAEL W. "Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later." **Molecular biology of the cell** 28.10 (2017): 1285-1287.
35. GRYNBERG, P., PASSOS-SILVA, D. G., MOURÃO, M. D. M., HIRATA JR, R., MACEDO, A. M., MACHADO, C. R., ... & FRANCO, G. R. (2012). *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. **PLoS One**, 7(1), e29596.
36. HARRELL KE, KOURY E, SMOLIKOVE S. Microirradiation for Precise, Double-strand Break Induction in vivo in *Caenorhabditis elegans*
37. HESSEN, DAG O. "Solar radiation and the evolution of life." *Solar radiation and human health* (2008): 123-136.
38. HÖRANDL E, HADACEK F. The oxidative damage initiation hypothesis for meiosis. **Plant Reprod.** 2013 Dec;26(4):351-67.
39. JENNI L, MARTI S, SCHWEIZER J, BETSCHART B, LE PAGE RWF, WELLS JM, TAIT A, PAINDAVOINE P, PAYS E, STEINERT M 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. **Nature** 322: 173-175.
40. KAY C, PEACOCK L, WILLIAMS TA, GIBSON W. Signatures of hybridization in *Trypanosoma brucei*. **PLoS pathogens.** 2022 Feb 9;18(2):e1010300.
41. KIVIC, P. A., & WALNE, P. L. (1984). An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida. *Origins of life*, 13(3-4), 269-288.
42. KOSTYGOV, A. Y., KARNKOWSKA, A., VOTÝPKA, J., TASHYREVA, D., MACISZEWSKI, K., YURCHENKO, V., & LUKEŠ, J. (2021). Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, 11(3), 200407.
43. KIVIC, P. A., & WALNE, P. L. (1984). An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida. **Origins of life**, 13(3-4), 269-288.



44. LI, XUAN, AND WOLF-DIETRICH HEYER. "Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance." **Cell research** 18.1 (2008): 99-113.
45. LIEBER, M. R., MA, Y., PANNICKE, U., AND SCHWARZ, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** doi:10.1038/nrm1202.
46. LIMA, VALDIRENE S., ANA M. JANSEN, LOUISA A. MESSENGER, MICHAEL A. MILES, AND MARTIN S. LLEWELLYN. "Wild Trypanosoma cruzi I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region." **Parasites & vectors** 7, no. 1 (2014): 1-8.
47. LIN, Z. et al. Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10328–10333, 2006.
48. LIU, J. et al. Presynaptic filament dynamics in homologous recombination and DNA repair. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 240–270, 2011.
49. LOURADOUR, ISABELLE, et al. "Stress conditions promote the mating competency of Leishmania promastigotes in vitro marked by expression of the ancestral gamete fusogen HAP2." **bioRxiv** (2021).
50. LUKEŠ, J., SKALICKÝ, T., TÝČ, J., VOTÝPKA, J., & YURCHENKO, V. (2014). Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, 195(2), 115-122.
51. LUKEŠ, JULIUS, RICHARD WHEELER, DAGMAR JIRSOVÁ, VOJTĚCH DAVID, AND JOHN M. ARCHIBALD. "Massive mitochondrial DNA content in diplomemid and kinetoplastid protists." **IUBMB life** 70, no. 12 (2018): 1267-1274.
52. MARTINS-MELO, F. R., ALENCAR, C. H., RAMOS, A. N., AND HEUKELBACH, J. (2012). Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 6, 1999–2007. doi:10.1371/journal.pntd.0001508.
53. MAZIN, ALEXANDER V., et al. "Rad54, the motor of homologous recombination." **DNA repair** 9.3 (2010): 286-302.

54. MICHOD, R. & LEVIN, B. R., The evolution of sex. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Publishers, 1988.
55. MOI, DAVID, et al. "Discovery of archaeal fusexins homologous to eukaryotic HAP2/GCS1 gamete fusion proteins." **Nature Communications** 13.1 (2022): 3880.
56. MOLYNEUX D, SAVIOLI L, ENGELS D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **Lancet**. 2016;23:30.
57. MORALES L, DUJON B. Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. **Microbiol Mol Biol Rev**. 2012 Dec;76(4):721-39.
58. NEDELCO, AURORA M., AND RICHARD E. MICHOD. "Sex as a response to oxidative stress: the effect of antioxidants on sexual induction in a facultatively sexual lineage." **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 270.suppl\_2 (2003): S136-S139.
59. NICHOLAS J. BUTTERFIELD, "Bangiomorpha pubescens n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes". v. 26 no. 3 p. 386-404 2000
60. PARANAÍBA, LARISSA FERREIRA. Interação triatomíneos-trypanosoma cruzi: desenvolvimento de diferentes dtus, papel das vesículas extracelulares e tentativa de hibridização. Orientador: interação triatomíneos-trypanosoma cruzi: desenvolvimento de diferentes dtus, papel das vesículas extracelulares e tentativa de hibridização. 2019. 112 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/31878>. Acesso em: 7 jul. 2022.
61. PEACOCK L, FERRIS V, SHARMA R, SUNTER J, BAILEY M, CARRINGTON M, et al. Identification of 585 the meiotic life cycle stage of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011;108: 3671–3676. doi:10.1073/pnas.1019423108
62. PENG, D., KURUP, S. P., YAO, P. Y., MINNING, T. A., AND TARLETON, R. L. (2015). CRISPR-Cas9- mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **MBio**. doi:10.1128/mBio.02097-14.
63. PÉREZ-MOLINA JA, MOLINA I. Chagas disease. **Lancet**. 2018 Jan 6;391(10115):82-94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28673423.

64. PIAZZA, A.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the formation of complex genomic rearrangements. **Physiology & behavior**, v. 29, n. 2, p. 135–149, 2019.
65. PITTELLA, JOSÉ EYMARD HOMEM. "O processo de avaliação em ciência e a indicação de Carlos Chagas ao prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42 (2009): 67-72.
66. PROUDFOOT C, MCCULLOCH R. 2005. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. **Nucleic Acids Res.** 33:6906–6919. 10.1093/nar/gki996
67. REGIS-DA-SILVA CG, FREITAS JM, PASSOS-SILVA DG, et al., Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol Biochem Parasitol.** 2006 Oct;149(2):191-200.
68. RAMÍREZ, J. D., et al. "First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype." **Zoonoses and public health** 61.7 (2014): 477-479.
69. READ, L. K., LUKEŠ, J., & HASHIMI, H. (2016). Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 7(1), 33-51.
70. RESENDE, BRUNO CARVALHO. Influência da Recombinação nos Processos de Dormência e Hibridização em *Trypanosoma cruzi*. 2019. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
71. RESENDE, BRUNO CARVALHO. et al. The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1– 13, 2020.
72. REPOLÊS, BRUNO MARÇAL. Metabolismo de DNA em *Trypanosoma cruzi*: vias de reparo mitocondrial e formação de híbridos. 2019. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
73. RUSSUM, S., LAM, K.J.K., WONG, N.A., IDDAMSETTY, V., HENDARGO, K.J., WANG, J., DUBEY, A., ZHANG, Y., MEDRANO-SOTO, A. AND SAIER JR, M.H., 2021.

Comparative population genomic analyses of transporters within the Asgard archaeal superphylum. **Plos one**, 16(3), p.e0247806.

74. SAGE E, SHIKAZONO N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. **Free Radic Biol Med**. 2017 Jun;107:125-135.

75. SANDRI, Thaisa et al. Encyclopedia of Infection and Immunity. In: TRYPANOSOMA cruzi. [S. l.]: **Elsevier**, 2022. v. 2, cap. Trypanosoma cruzi, ISBN 978-0-323-90303-5.

76. SCHWABL, PHILIPP, et al. "Parallel sexual and parasexual population genomic structure in Trypanosoma cruzi." *BioRxiv* (2018): 338277.

77. SCHAUB GA. An Update on the Knowledge of Parasite-Vector Interactions of Chagas Disease. **Res Rep Trop Med**. 2021 May 28;12:63-76. doi: 10.2147/RRTM.S274681. PMID: 34093053; PMCID: PMC8169816.

78. SCHWABL, PHILIPP, HIDEO IMAMURA, FREDERIK VAN DEN BROECK, JAIME A. COSTALES, JALIL MAIGUASHCA-SÁNCHEZ, MICHAEL A. MILES, BJORN ANDERSSON, MARIO J. GRIJALVA, AND MARTIN S. LLEWELLYN. "Meiotic sex in Chagas disease parasite Trypanosoma cruzi." **Nature communications** 10, no. 1 (2019): 3972.

79. SHIKANAI-YASUDA, MARIA APARECIDA, AND NOEMIA BARBOSA CARVALHO. "Oral transmission of Chagas disease." **Clinical Infectious Diseases** 54.6 (2012): 845-852.

80. SILVA, VERÔNICA SANTANA DA, AND CARLOS RENATO MACHADO. "Sex in protists: A new perspective on the reproduction mechanisms of trypanosomatids." **Genetics and Molecular Biology** 45 (2022).

81. SONG, QINQIN, et al. "DNA Holliday Junction: History, Regulation and Bioactivity." *International Journal of Molecular Sciences* 23.17 (2022): 9730.

82. SOUZA, C. A., CARLA C. SILVA, AND A. V. FERREIRA. "Sex in fungi: lessons of gene regulation." **Genet Mol Res** 2.1 (2003): 136-147.

83. STOECK T, SCHWARZ MV, BOENIGK J, SCHWEIKERT M, VON DER HEYDEN S, BEHNKE A 2005. Cellular identity of an 18S rRNA gene sequence clade within the class Kinetoplastea: the novel genus Actuariola gen. nov. (Neobodonida) with description of the type species Actuariolaframvarensis sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** 55: 2623-2635.

84. STURM NR, CAMPBELL DA. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2010;115:35–43.
85. STURM NR, VARGAS NS, WESTENBERGER SJ, ZINGALES B, CAMPBELL DA 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi* **Int J Parasitol** 33: 269-279.
86. TOMASINI, NICOLÁS, AND PATRICIO DIOSQUE. "Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110 (2015): 403-413.
87. WESTENBERGER SJ, BARNABÉ C, CAMPBELL DA, STURM NR 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi* *Genetics* 171: 527-543.
88. WOESE, CARL R., OTTO KANDLER, AND MARK L. WHEELIS. "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 87.12 (1990): 4576-4579.
89. WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10524–10535, 2018.
90. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis) (2029). WHO. Available at: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/chagas-disease> (Acessado: Maio de 2021).
91. YEELES, J. T. P., AND DILLINGHAM, M. S. (2010). The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase-nuclease complexes. **DNA Repair (Amst)**. doi:10.1016/j.dnarep.2009.12.016.
92. ZHAO, F., KIM, W., KLOEBER, J. A., AND LOU, Z. (2020). DNA end resection and its role in DNA replication and DSB repair choice in mammalian cells. **Exp. Mol. Med.** 52, 1705–1714. doi: 10.1038/s12276-020-00519-1
93. ZINGALES B, SOUTO RP, MANGIA RH, LISBOA CV, CAMPBELL DA, COURA JR, JANSEN A, FERNANDES O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol** 28: 105-112.

94. ZINGALES, B., ANDRADE, S.G., BRIONES, M.R.D.S., CAMPBELL, D.A., CHIARI, E., FERNANDES, O., GUHL, F., LAGES-SILVA, E., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R. AND MILES, M.A., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, pp.1051-1054.
95. ZINGALES, B., MILES, M. A., CAMPBELL, D. A., TIBAYRENC, M., MACEDO, et al., The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution**, 12(2), 240-253. 2012.