

Danielle Gomes Passos Silva

**ESTUDOS SOBRE OS MECANISMOS DE  
RECOMBINAÇÃO EM *TRYPANOSOMA CRUZI*:  
OBTENÇÃO E ANÁLISE DE CÉLULAS  
SUPEREXPRESSANDO O GENE TcRAD51**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Carlos Renato Machado

Co-Orientadora: Prof. Santuza M. R. Teixeira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Agosto/2006

## Agradecimentos

Agradeço inicialmente ao Nem pelo o otimismo frente aos problemas, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de trabalhar com esse assunto tão interessante que é o reparo de DNA.

À Santuza, pelo exemplo de dedicação e competência destinada a pesquisa e pela disponibilidade para auxiliar na solução de problemas.

Aos professores Sérgio, Andréia e Glória pelas importantes sugestões dadas nas reuniões para que esse trabalho fosse melhor executado.

Ao Jorge, Muito obrigado por me transmitir tanto conhecimento, de forma tão correta e aprofundada e por ser essa pessoa sempre disponível.

Ao Carlos Gustavo pelos conselhos valiosos e pelas várias discussões proveitosas.

À Carolzinha, por sua alegria, amizade, confiança e também por me introduzir no mundo da cultura de *T. cruzi*.

À Marcela, por sempre ser essa grande amiga. Muito obrigado por sempre ter me apoiado durante todos esses anos.

Aos todos os amigos do LGB, por tornarem esse ambiente de trabalho tão agradável. Muito obrigada a todos: Michelle, Alice, Débora Aline, Matheus, João Pedro, Carlos Eduardo, Bruno, Simone Pires, Helder, Antônio, Debrinha, Pedro, Marina, Cadú, Chico, Michael, Alessandra Campos, Vanessa, Ferdi, Luciana, Alessandra, Simone Santos, Marina, Claudiney, Fernanda, Lucas e Rogério.

A Neuza, Kátia e Rúbia obrigado por facilitar o nosso trabalho, disponibilizando a infra-estrutura tao importante para a realização desse mestrado.

A todos do Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitos, principalmente, a Dani Marra, Priscila e Rosiane, que me auxiliaram em tantos experimentos. Muito obrigado pela acolhida nesse laboratório.

Aos amigos da graduação por serem esses grandes amigos que propiciam tantos momentos de alegria.

Ao meu pai pelo amor, carinho e dedicação dado a mim de forma tão plena mesmo que por tão pouco tempo.

A minha mãe por ser esse exemplo de pessoa que me ensina valores tão importantes a cada dia. Muito obrigado pelo companheirismo, apoio e pelo colo.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e providenciaram todas as condições que possibilitassem o meu crescimento tanto pessoal quanto profissional. Sem vocês eu nunca tinha chegado aonde cheguei. Ao Renatinho, por ser essa pessoa forte e ser um dos principais responsáveis por tornar essa família tão unida e claro que sem ele, as pessoinhas tão lindas como os meus afilhados, Léo e Renatinha, não existiriam. À Lêda por ser exemplo de perseverância e vontade de viver e de trazer ao mundo essa outra pessoinha linda, o Dan. À Judith, por ser um exemplo de sucesso e por sempre tentar me oferecer o que há de melhor, muito obrigada por tantas oportunidades já oferecidas. Ao Márcio com seu jeito único de ser e que da sua forma, sempre acaba me ajudando. Ao Marcelo, por sempre tentar trazer equilíbrio para a família e por sua sensatez para resolver os problemas. E também a todos os meus cunhados e cunhadas que complementam essa família.

Ao Pá por acreditar no meu potencial tanto pessoal quanto profissional e por fazer tantos investimentos em mim. Você ocupa um lugar muito especial na minha vida. Muito obrigado mesmo.

Aos meus demais familiares, tios e primos, por estarem sempre presente na minha vida.

Ao Bruninho, por ser essa pessoa maravilhosa em tantos aspectos. Muito obrigado pelo amor, confiança, calma e carinho tão importantes em momentos difíceis.

# Índice

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>                                                    | <b>7</b>  |
| <b>ABREVIATURAS.....</b>                                                         | <b>9</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>                                                               | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                             | <b>13</b> |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                           | <b>15</b> |
| <b>I. O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....</b>                                       | <b>15</b> |
| <b>II. DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....</b>        | <b>18</b> |
| <b>III. MECANISMOS DE RECOMBINAÇÃO NO GENOMA.....</b>                            | <b>21</b> |
| <b>IV. RAD51 E A RECOMBINAÇÃO EM TRIPANOSOMATÍDEOS .....</b>                     | <b>27</b> |
| <b>V. REPARO DE DNA E RECOMBINAÇÃO EM <i>T. CRUZI</i>.....</b>                   | <b>28</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                            | <b>33</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                   | <b>34</b> |
| <b>I. CULTURA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E TRANSFECCÃO.....</b>                 | <b>34</b> |
| <b>II. SELEÇÃO E ANÁLISE DE CLONES TRANSFECTADOS.....</b>                        | <b>35</b> |
| <b>III. CLONAGEM E OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS .....</b>                             | <b>36</b> |
| <b>IV. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>T. CRUZI</i> E <i>NORTHERN BLOT</i> .....</b> | <b>37</b> |
| <b>IV.1. HIBRIDAÇÃO E MARCAÇÃO DA SONDA. ....</b>                                | <b>38</b> |
| <b>V. ELETROFORESE EM CAMPO PULSÁTIL (PFGE).....</b>                             | <b>40</b> |
| <b>VI. TRANSFERÊNCIA DE <i>SOUTHERN BLOT</i>.....</b>                            | <b>41</b> |
| <b>VII. ENSAIOS UTILIZANDO TRATAMENTO COM AGENTES GENOTÓXICOS.....</b>           | <b>42</b> |

|                                                                                                                                     |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>VIII. ENSAIOS DE RECOMBINAÇÃO .....</b>                                                                                          | <b>43</b>        |
| <b><u>RESULTADOS.....</u></b>                                                                                                       | <b><u>45</u></b> |
| <b>I. OBTENÇÃO DO VETOR PARA SUPEREXPRESSÃO DE TcRAD51.....</b>                                                                     | <b>45</b>        |
| <b>II. TRANSFEÇÃO E OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE <i>T. CRUZI</i> SUPEREXPRESSANDO TcRAD51 .....</b>                                     | <b>49</b>        |
| II.1. ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DE TcRAD51 EXÓGENO NO GENOMA DOS PARASITOS TRANSFECTADOS .....                                          | 49               |
| II.2. ANÁLISE DO mRNA DOS PARASITOS TRANSFECTADOS .....                                                                             | 50               |
| <b>III. TRATAMENTO DOS PARASITOS SUPEREXPRESSANDO TcRAD51 COM AGENTES GENOTÓXICOS QUE CAUSAM QUEBRAS DE FITA DUPLA DO DNA. ....</b> | <b>53</b>        |
| III.1. TRATAMENTO COM ZEOCINA .....                                                                                                 | 53               |
| III.2. IRRADIAÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> SUPEREXPRESSANDO TcRAD51 .....                                                                 | 53               |
| III.3. ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO DO DNA APÓS A IRRADIAÇÃO. ....                                                                        | 58               |
| <b>IV. ENSAIOS DE RECOMBINAÇÃO .....</b>                                                                                            | <b>60</b>        |
| <b>V. ANÁLISE DE CLONES SUPEREXPRESSORES DE TcRAD51. ....</b>                                                                       | <b>63</b>        |
| V.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TcRAD51 NOS CLONES OBTIDOS A PARTIR DA CULTURA TRANSFECTADA .....                                      | 63               |
| V.2. ANÁLISE DO CRESCIMENTO DOS CLONES SUPEREXPRESSORES DE TcRAD51.....                                                             | 65               |
| <b><u>DISCUSSÃO.....</u></b>                                                                                                        | <b><u>67</u></b> |
| <b><u>PERSPECTIVAS .....</u></b>                                                                                                    | <b><u>80</u></b> |
| <b><u>BIBLIOGRAFIA.....</u></b>                                                                                                     | <b><u>81</u></b> |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1: CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....                                                                                                                               | 17 |
| FIGURA 2: O PAPEL DAS PROTEÍNAS DO GRUPO EPISTÁTICO DE RAD52 NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA. ....                                                                                             | 23 |
| FIGURA 3: COMPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS DE RECA, ScRAD51 E HsRAD51. ....                                                                                                                      | 26 |
| FIGURA 4: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>T. CRUZI</i> À RADIAÇÃO GAMA. ....                                                                                                               | 32 |
| FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO PROCKGFPHYGRO.....                                                                                                                                 | 46 |
| FIGURA 6. GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO CONTENDO OS PRODUTOS DA PCR DE COLÔNIAS TRANSFORMADAS COM A LIGAÇÃO CONTENDO PROCKGFPHYGRO E TcRAD51.....                         | 48 |
| FIGURA 7: PFGE DE DNA EXTRAÍDO DE <i>T. CRUZI</i> SELVAGEM (WT) E TRANSFECTADO COM TcRAD51 (RAD51). ....                                                                                | 51 |
| FIGURA 8: <i>NORTHERN BLOT</i> DE TcRAD51.....                                                                                                                                          | 52 |
| FIGURA 9: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>T. CRUZI</i> SELVAGEM (WT) E TRANSFECTADO COM TcRAD51 (RAD51) SUBMETIDOS A ZEOCINA NAS DOSES DE 64 E 640UG/ML. ....                              | 54 |
| FIGURA 10: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>T. CRUZI</i> SELVAGEM (WT) E TRANSFECTADO COM TcRAD51 (RAD51) IRRADIADOS COM 0 GY E 500 GY.....                                                   | 56 |
| FIGURA 11: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>T. CRUZI</i> SELVAGEM (WT) E TRANSFECTADO COM TcRAD51 (RAD51) IRRADIADOS COM 0 GY E 500 GY.....                                                   | 57 |
| FIGURA 12: PFGE DO DNA DOS PARASITOS SELVAGENS E SUPEREXPRESSANDO TcRAD51 ANTES DA IRRADIAÇÃO E DIFERENTES TEMPOS (0, 6, 24, 30 E 48H) APÓS A EXPOSIÇÃO A 500 GY DE RADIAÇÃO GAMA. .... | 59 |
| FIGURA 13: ENSAIO DE RECOMBINAÇÃO ATRAVÉS DA INTEGRAÇÃO DE DNA EXÓGENO NO GENOMA DE PARASITOS CONTROLE E SUPEREXPRESSANDO TcRAD51. ....                                                 | 62 |

FIGURA 14: *NORTHERN BLOT* DE CLONES SUPEREXPRESSANDO TcRAD51 ..... 64

FIGURA 15: CURVA DE CRESCIMENTO DE *T. CRUZI* SELVAGEM (WT), DA POPULAÇÃO  
TRANSFECTADA COM TcRAD51 (RAD51) E DOS CLONES SUPEREXPRESSANDO  
TcRAD51 (16, 9 E 14)..... 66

## Abreviaturas

AP: Apurínicos/Apirimídínicos

ATP: Adenosina Trifosfato

BHI: *Brain Heart Infusion*

UDGase: Uracil DNA glicosilase

BSA: Albumina de soro bovina

DNA: Acido desoxirribonucléico

EDTA: Acido etilenodiaminotetracético

EPB: *Electroporation phosphate buffer*

ESP: EDTA sarcosine proteinase K

GFP: *Green Fluorescent Protein*

LIT: *Liver Infusion Tryptone*

LMP: *Low Melting Point*

MMS: Metil-metano sulfonato

MOPS: *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*

mRNA: RNA mensageiro

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PSG: *Phosphate saline glucose*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis*

RNA: Acido ribonucléico

rRNA: RNA ribossômico

ROS: *Reactive Oxygen Species*

SDS: Duodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

SSC: *Saline Sodium Citrate Buffer*

TAE: Tris-acetato EDTA

TBE: Tampão Tris-borato EDTA

TE: Tris-EDTA

UV: Ultravioleta

WT: *Wild type*

VSG: *Variant Surface Glycoprotein*

## Resumo

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas. Somente poucos genes envolvidos no metabolismo de DNA foram descritos nessa espécie. Recentemente, nosso grupo caracterizou em *T. cruzi*, o gene codificador para uma das principais proteínas envolvidas na recombinação homóloga, a proteína TcRad51. Visando entender melhor o papel de Rad51 em processos de recombinação nesse parasita, esse gene foi superexpresso no clone CL Brener de *T. cruzi*. Após a verificação da superexpressão do mRNA de TcRad51 nas culturas transfectadas através da técnica de *northern blot*, esses parasitos foram submetidos a agentes que causam quebras de fita dupla, tais como a radiação gama e a droga zeocina. Foi observado que a superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência a esses agentes. Além disso, foi verificado que esse aumento corresponde a uma cinética de recuperação mais rápida do DNA fragmentado nos parasitos transfectados, observada através de eletroforese em campo pulsátil. Além do seu papel no reparo de quebra de fita dupla, o envolvimento do gene TcRad51 no processo de recombinação foi avaliado em ensaios de transfecção e integração de fragmentos exógenos no genoma do parasita. Parasitos selvagens e superexpressando TcRad51 foram transfectados com plasmídeo contendo o gene de resistência ao antibiótico G418 e da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) e sequências homólogas ao gene de tubulina. Verificou-se que a superexpressão de TcRad51 resulta em aumento do número de clones resistentes a G418 e capazes de expressar GFP, os quais, provavelmente, tiveram o plasmídeo integrado no *locus* de tubulina. Nós também obtivemos clones derivados de culturas transfectadas superexpressando TcRad51. Os

clones apresentaram níveis variáveis de expressão de TcRad51, mas não demonstraram diferenças em seu crescimento quando comparados com a população transfectada e as células selvagens. Novas análises com esses clones deverão contribuir para investigar melhor a importância de Rad51 na manutenção da estabilidade genômica desse parasita e no metabolismo de DNA em *T. cruzi*.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* is the parasite that causes Chagas' disease. Only a few genes involved in DNA metabolism have been described in this species. Recently, our group characterized a gene encoding one of the key proteins involved in homologous recombination in *T. cruzi*, TcRad51. To better understand this process, we over-expressed TcRad51 in the CL Brener strain of *T. cruzi*. Northern blot assays showed an increase in mRNA levels of TcRad51 in the population of transfected cells as well as in cloned transfected cell lines. When we submitted these cells to agents that cause double strand DNA breaks, such as gamma radiation and Zeocin, we observed that cells over-expressing TcRad51 show an increased resistance to both agents. In addition, using pulse field gel electrophoresis (PFGE), we observed a difference in the level of fragmentation of genomic DNA after exposition to gamma radiation, with the kinetics of chromosomal reconstitution being faster in transfected cells than in wild type cells. These results indicate TcRad51 has a role in the maintenance of genomic stability in this parasite, and participates in the process of double strand break repair after exposure to genotoxic agents. In addition, we also investigate the involvement of TcRad51 in gene targeting by homologous recombination. Wild type parasites and cells over-expressing TcRad51 were transfected with plasmids containing a drug resistance gene, the GFP gene and sequences homologous to tubulin. It was observed that cells over-expressing TcRad51 shows an increase in the number of clones resistant to G418 and GFP positive, which have probably the plasmid integrated into the tubulin locus. We also obtained clones derived from transfected cultures over-expressing TcRad51. The clones show similar growth when compared with the transfected

population and wild type cells but show variable levels of TcRad51 mRNA expression. Further analysis using these clones will allow us to better understand the role of the TcRad51 gene in the *T. cruzi* DNA metabolism.

## Introdução

### I. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado descrito por Carlos Chagas em 1909. Esse parasita pertence à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastidae, na qual estão incluídos os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Essa ordem se caracteriza pela presença do cinetoplasto, mitocôndria única e alongada, com grande conteúdo de DNA, localizada próximo ao corpo basal do flagelo. Os kinetoplastídeos apresentam características não usuais relacionadas à expressão gênica, possivelmente devido a sua grande divergência em relação aos demais eucariotos. Esses organismos apresentam transcrição policistrônica, regulação da expressão gênica principalmente através de mecanismos pós-transcricionais, entre outras estratégias biológicas distintas (revisado em Teixeira & DaRocha, 2003).

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. Sua zona endêmica abrange 21 países da América Latina. Atualmente é estimado que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo 3,0 a 3,3 milhões de casos sintomáticos (WHO, 2006). No entanto, nenhuma terapia tolerada foi eficiente, especialmente contra a fase crônica da doença. Portanto, pesquisas básicas e aplicadas no mecanismo de invasão do hospedeiro, de geração de resposta imune e da patogênese da doença de Chagas são de grande importância.

O parasita é transmitido para o homem por vetores triatomíneos hematófagos, por transfusão de sangue ou por transmissão congênita. O ciclo

de vida deste parasita alterna-se entre hospedeiros vertebrados, principalmente mamíferos, e insetos Reduviídeos hematófagos da família Triatominae, com diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros: formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicos infectivos em vetores hematófagos e formas amastigotas intracelulares replicativas e tripomastigotas na corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos (Figura 1) (WHO, 2006).

A infecção de *T. cruzi* apresenta uma grande variabilidade clínica em humanos. Inicialmente, a doença se caracteriza por uma alta parasitemia culminando com a disseminação do protozoário em diversos tecidos. Os sintomas podem ser leves ou atípicos, e por esse motivo a infecção não é geralmente reconhecida nesse estágio. Após a fase aguda, os pacientes entram na forma indeterminada da fase crônica que pode durar por muitos anos ou persistir indefinidamente. Ela é caracterizada pela falta de sintomas clínicos relevantes e parasitemia muito pequena ou indetectável, porém muitos pacientes continuam soropositivos para o *T. cruzi*. Dentro de vinte anos após a infecção, cerca de 35% dos pacientes desenvolvem sinais biológicos característicos da doença de Chagas tais como cardiomegalia, ou seja, aumento do volume do coração, aumento de órgãos gastrointestinais como o cólon e esôfago, além de danos ao sistema nervoso periférico (WHO, 2006).

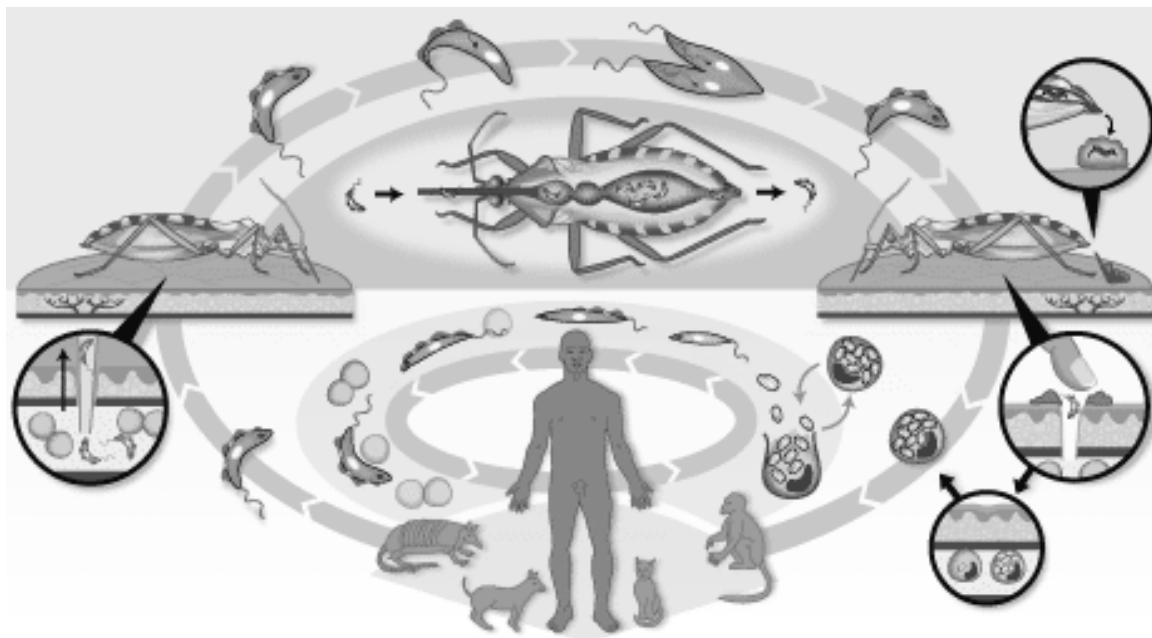


**Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*** (WHO, 2006). O ciclo de vida deste parasita alterna-se entre hospedeiros vertebrados, principalmente mamíferos, e insetos reduvídeos hematófagos da família Triatominae, com diferentes estágios de desenvolvimento em cada um dos hospedeiros: formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicos infectivos em vetores hematófagos e formas amastigotas intracelulares replicativas e tripomastigotas na corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos.

## II. Diversidade genética da espécie *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta uma vasta diversidade intraespecífica, apresentando heterogeneidade genotípica que gera grande variabilidade no fenótipo das diversas cepas. O *T. cruzi* tem sido alvo de vários estudos que mostraram essa grande diversidade em aspectos morfológicos (formas delgadas, largas e intermediárias), taxa de crescimento, constituição antigênica, patogenicidade, potencial infectivo, suscetibilidade a droga, número de cromossomos e conteúdo de DNA (revisado em Buscaglia & Di Noia, 2003).

Tendo em vista essa grande variabilidade, vários estudos foram realizados utilizando diferentes marcadores, na tentativa de agrupar as cepas e encontrar padrões biológicos relacionados a variantes da doença. Em 1998, foram definidas duas principais linhagens: *T. cruzi I* e *T. cruzi II*, porém outras subdivisões também foram sugeridas (Brisse *et al*, 2000). Essas duas linhagens foram identificadas através de estudos com isoenzimas (Miles *et al*, 1977), rDNA 24S $\alpha$  e polimorfismos de genes mini-exons (Souto & Zingales, 1993; Souto *et al*, 1996). Recentemente, estudos utilizando marcadores como microssatélites, genes mitocondriais e nucleares, rDNA 24S $\alpha$ , dentre outros, tem sugerido a existência de uma terceira linhagem (Robello *et al*, 2000; Machado & Ayala, 2001; Augusto-Pinto *et al*, 2003; Freitas *et al*, 2006). Apesar dessa classificação, algumas cepas, incluindo as de caráter híbrido não puderam ser agrupadas em nenhuma das linhagens identificadas. Além disso, uma das características apresentadas pelas linhagens são os distintos nichos ecológicos que ocupam. Há fortes evidências da associação de *T. cruzi II* com a doença humana, enquanto *T. cruzi I* é encontrado preferencialmente no ciclo

silvestre, afetando marsupiais e edentados (Zingales *et al*, 1999; Di Noia *et al*, 2002).

Essa grande variabilidade apresentada entre as cepas se deve à divergência clonal decorrente da reprodução assexuada desse parasita. Isso ocorre porque cada clone representa uma linhagem independente que divide por fissão binária e evolui somente através do acúmulo de mutações a partir de seu ancestral. Algumas evidências indicam que a estrutura populacional de *T. cruzi* se baseia na clonalidade, como a presença de forte desequilíbrio de ligação e grandes desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tibayrenc, 1986). Além disso, em organismos assexuados é esperado grande divergência entre alelos como resultado do acúmulo independente de mutações. Tal fenômeno foi denominado recentemente “efeito de Meselson” e foi demonstrado em rotíferos bdelóides assexuados (Welch & Meselson, 2000).

No entanto, em *T. cruzi*, estudos com microssatélites e genes nucleares mostraram um excesso de alelos homozigotos na maioria das cepas desse organismo (Machado & Ayala, 2001) (Oliveira *et al*, 1998). Essa homozigose pode ser explicada devido a três principais mecanismos: troca genética, conversão gênica e recombinação mitótica (Machado & Ayala, 2001).

Evidências na estrutura populacional de *T. cruzi* mostram que é possível a ocorrência de troca genética entre as cepas dessa espécie. Um dos estudos se baseia na afirmação que todos os genes neutros de uma linhagem sob clonagem estrita devem compartilhar a mesma história de divergência, porque o genoma completo é transmitido intacto a cada geração, enquanto genes de organismos que se reproduzem sexualmente tendem a ter histórias muito

diferentes porque o genoma é recombinado a cada geração (Dykhuizen & Green, 1991). As cepas consideradas híbridas da espécie *T. cruzi* possuem incongruência de árvores genealógicas baseadas em marcadores nucleares e mitocondriais, o qual não é esperado quando o organismo está sob clonalidade estrita. Dessa forma, é provável a ocorrência de troca genética nessa espécie (Machado & Ayala, 2001).

Além disso, recentemente, verificou-se que o *Trypanosoma cruzi* é capaz de realizar fusão celular com a conseqüente duplicação do genoma e formação de híbridos. Isso foi demonstrado através da fusão de clones biológicos transfectados com vetores externos que codificam para a resistência a diferentes antibióticos. Após a formação dos híbridos, podem ocorrer processos de perda de material genético e recombinação entre os genomas (Gaunt *et al*, 2003).

Esses estudos sugerem, portanto, que a troca genética também tenha gerado diversidade genética em *T. cruzi* através do surgimento de cepas híbridas. No entanto, esse mecanismo é um evento raro, pois apesar da origem do genótipo híbrido poder ser explicada pela ocorrência da troca genética, sua manutenção como genótipos estáveis ao longo do tempo e do espaço é consistente com a prevalência da reprodução assexuada nesse organismo (Machado & Ayala, 2001).

Além disso, apesar da sua ocorrência em *T. cruzi*, a troca genética não explica o excesso de alelos homozigotos, pois, analisando-se os genótipos dos híbridos se observa a presença de heterozigose para a maioria dos genes analisados. A presença de homozigose sem que ocorra troca genética também

foi vista em espécies ostracóides assexuadas *Darwinula stevensoni*. Nessa espécie, a conversão gênica foi identificada como a responsável pela homogeneização dos alelos (Schön & Martens, 2003). Assim, parece plausível que a homozigose presente na maioria das cepas de *T. cruzi* tenha surgido devido à conversão gênica e a recombinação mitótica.

Dessa forma, o estudo da recombinação em *T. cruzi* pode ser muito informativo quanto à geração de variabilidade nesse organismo.

### **III. Mecanismos de recombinação no genoma**

A recombinação homóloga é um tipo de rearranjo genético que ocorre através da quebra e junção de moléculas de DNA em trechos de seqüências idênticas ou muito similares. A recombinação homóloga é um mecanismo que pode conferir diversidade genética no genoma de uma espécie através do rearranjo de alelos. Ao mesmo tempo, esse mecanismo mantém a integridade do genoma através do reparo acurado de vários tipos de dano ao DNA, principalmente quebras de fita dupla. Essas lesões podem ser geradas como resultado do colapso da forquilha de replicação, do processamento de danos espontâneos e através da exposição à agentes danosos ao DNA (Shibata *et al*, 2001).

Estudos genéticos em *Saccharomyces cerevisiae* permitiram a identificação de genes relacionados ao reparo de danos no DNA causados pela radiação ionizante, que gera quebras de fita dupla. Mutações nesses genes causam defeitos na recombinação mitótica e meiótica, evidenciando a ligação entre o reparo de quebras de fita dupla e a recombinação homóloga. Esses genes pertencem ao grupo epistático de RAD52, e são eles: RAD50, RAD51,

RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, RDH54 [TID1], MRE11 [RAD58], e XRS2. Homólogos desses genes têm sido identificados em muitos eucariotos e em alguns casos em procariotos e arqueobactérias, indicando uma alta conservação da via de reparo por recombinação, e demonstrando, assim, a sua importância (revisado em Symington, 2002).

Em linhas gerais, a recombinação se inicia após a quebra de fita dupla de DNA. A extremidade 3' dessas fitas é processada, através da ação de nucleases e helicases, para formação de uma cauda de fita simples. A cauda resultante é ocupada pela proteína de ligação à fita simples de DNA, RPA que minimiza a formação de estruturas secundárias nessa fita. Posteriormente, RPA é deslocada pelo complexo Rad51/Rad52, permitindo o acesso de proteínas Rad51 à fita simples. Um nucleofilamento de Rad51 é formado contendo várias moléculas de Rad51 ligadas à fita simples (revisado em Symington, 2002). Essa estrutura se estabiliza através da ligação ao complexo protéico Rad55/57 (Sung *et al*, 2003). Posteriormente, o nucleofilamento de Rad51 invade a fita dupla do cromossomo homólogo e procura por homologia. A proteína Rad54 auxilia nesse processo através do relaxamento da fita dupla possibilitando o pareamento entre as fitas. A estrutura formada é então, resolvida pela ação de DNA polimerases, ligases e resolvases (revisado em Symington, 2002) (Figura2).

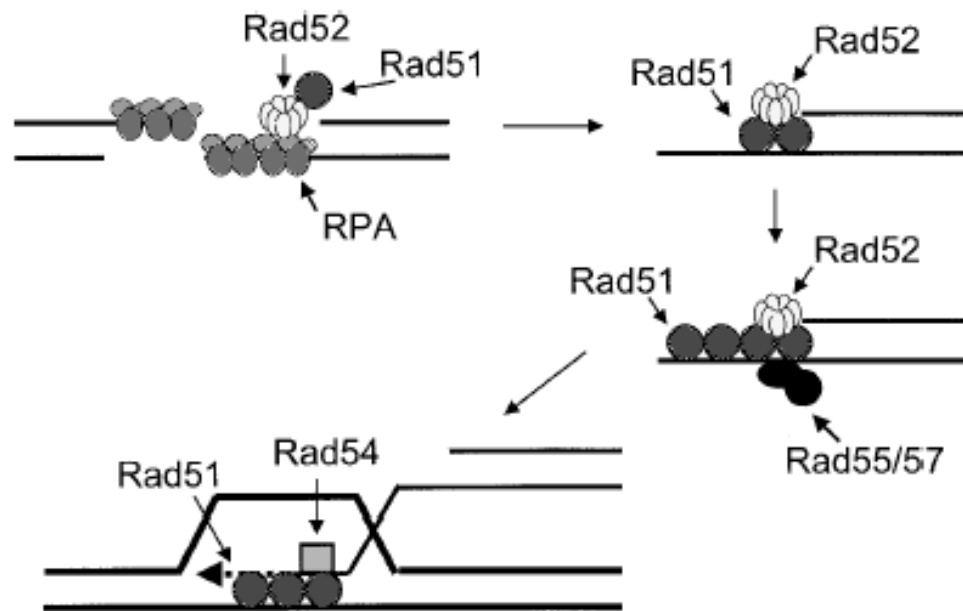


**Figura 2: O papel das proteínas do grupo epistático de Rad52 na recombinação homóloga.** A fita simples resultante do processamento da quebra de fita dupla é ocupada, inicialmente, pela proteína de ligação à fita simples, RPA. Posteriormente, RPA é substituída pela proteína Rad51, através do auxílio do complexo Rad51/Rad52. O nucleofilamento formado pela fita simples de DNA e Rad51 é estabilizado pelo complexo Rad55/57. O nucleofilamento invade a fita dupla do cromossomo homólogo e procura por homologia. A proteína Rad54 permite o relaxamento da fita dupla possibilitando o pareamento entre as fitas, propiciando o início da recombinação (Figura adaptada de Symington, 2002).

Além dessas proteínas, uma série de parálogos de Rad51 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3) foi identificada em vertebrados e são capazes de interferir sobre o processo de recombinação por interagir ou influenciar a função da própria Rad51 (Yonetani *et al*, 2005). Recentemente, foi caracterizada a proteína Rad51C, que além de garantir uma fonte de regulação da montagem do foco de Rad51, tem um papel direto no reparo (Rodrigue *et al*, 2006). Os parálogos de Rad51 têm uma ação conjunta para formação do foco de Rad51, entretanto, eles podem ter papéis diferentes dependendo do tipo de lesão e do estágio do processo de reparo.

O pareamento de DNA homólogo e a reação de troca de fitas são os passos chaves do processo de recombinação. Elas ocorrem através da ação de uma classe de enzimas recombinases conservadas denominadas RecA em *Escherichia coli* e Rad51 em eucariotos. Essas proteínas se ligam cooperativamente ao DNA para formar filamentos nucleoproteicos. Essa estrutura medeia o pareamento e a troca de fitas entre moléculas de DNA homólogas através da ligação de ATP (Baumman *et al*, 1996; Sung & Stratton, 1996; Roca & Cox, 1997). Recentemente, foi demonstrado que Rad51 pode deslizar sobre a fita dupla de DNA por longos períodos de tempo até ser imobilizada na extremidade do DNA. Dessa forma, foi proposto que a proteína Rad51 “procura” por regiões no DNA que necessitam de reparo (Granéli *et al*, 2006).

As proteínas RecA e Rad51 além de possuírem a função conservada, são estruturalmente similares. Essas proteínas possuem um domínio central conservado que possibilita a ligação do ATP a essas proteínas (Shinohara *et*

*al*, 1992; Ogawa *et al*, 1993). Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a estrutura tridimensional de filamentos formados pela ligação do DNA a essas recombinases é também conservada (Ogawa *et al*, 1993). Apesar dessas similaridades, o alinhamento das seqüências de aminoácidos dessas duas proteínas revela uma extensão na extremidade N-terminal de Rad51, ausente em RecA e uma extensão na extremidade C-terminal de RecA, ausente em Rad51. Essas regiões correspondem ao domínio de ligação dessas proteínas ao DNA, sendo, essenciais para essas recombinases desenvolverem o reparo de quebra de fita dupla (Aihara *et al*, 1999; Kurumizaka *et al*, 1996; Bauman & West, 1998) (Figura 3).

Vários estudos têm demonstrado a importância da proteína Rad51 na estabilidade genômica em eucariotos, através do reparo de quebra dupla de DNA (revisado em Symington, 2002). Essa proteína está envolvida no reparo de quebras espontâneas de cromossomos em células proliferativas de vertebrados (Sonoda *et al*, 1998), como também na resistência a agentes genotóxicos (Basile *et al*, 1992; Vispe *et al*, 1998). Após a exposição a esses agentes, foi observada a formação de foco de Rad51 no núcleo de células de mamífero (Haaf *et al*, 1995). Apesar de desempenhar esse papel na recuperação de DNA lesionados, em vertebrados, Rad51 pode contribuir potencialmente para a instabilidade genômica causada pela hiperrecombinação (Orre *et al*, 2006). Foi observada a superexpressão de Rad51 em células tumorais de humanos de diferentes linhagens celulares (Xia *et al*, 1997). Altos níveis dessa proteína podem promover rearranjos cromossômicos e

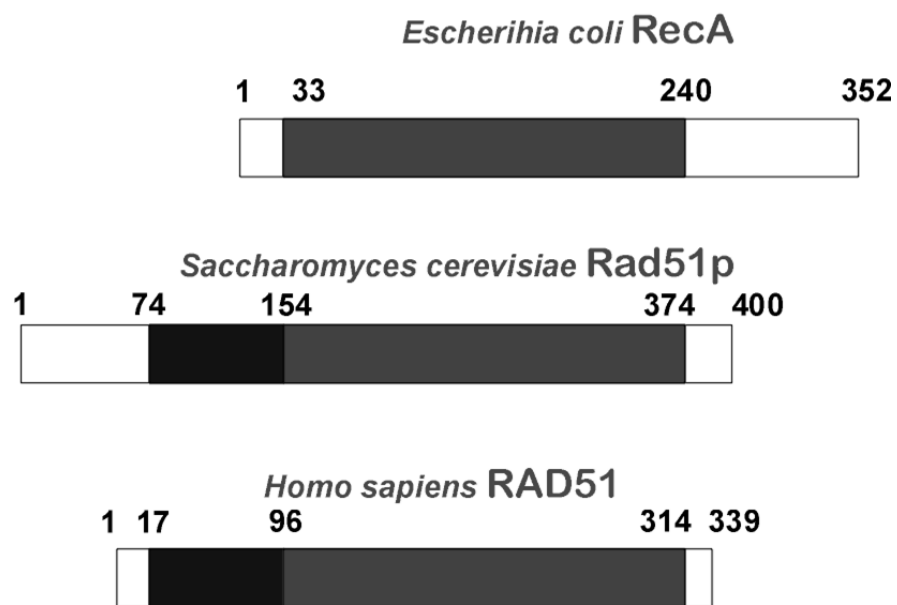


**Figura 3: Comparação dos domínios de RecA, ScRad51 e HsRad51.**

Os domínios em rosa mostram as regiões que possuem homologia entre RecA e Rad51. Os domínios em azul mostram a extremidade N-terminal de Rad51, ausente em RecA (Baumman & West, 1998).

aneuploidia quando seguido de tratamento com agentes genotóxicos (Richardson *et al*, 2004).

#### **IV. Rad51 e a recombinação em tripanosomatídeos**

O gene Rad51 foi descrito e caracterizado em dois organismos evolutivamente próximos de *T. cruzi*: *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*. O parasita *L. major* é um dos agentes etiológicos da leishmaniose. O gene Rad51 e a proteína que ele codifica foram caracterizados nessa espécie. A proteína LmRad51 possui propriedades bioquímicas similares a Rad51 de outros organismos, tais como: a ligação ao DNA e a atividade ATPásica estimulada por essa ligação. A expressão do mRNA de LmRad51 não é detectável em culturas de *L. major* crescendo exponencialmente em condições normais. No entanto, essa expressão é induzida após a exposição ao agente genotóxico fleomicina, produzindo altos níveis de mRNA de LmRad51. Esse resultado sugere que LmRad51 participa da resposta a danos no DNA. O reparo de DNA é importante para a sobrevivência desse parasita durante a infecção, devido à exposição a danos oxidativos no DNA gerados pela resposta intracelular do hospedeiro (McKean *et al*, 2001).

O parasita *Trypanosoma brucei* é o causador da doença do sono. Nesse tripanossomatídeo, foi visto que Rad51 possui um papel no processo de variação antigênica, o qual possibilita o escape do parasita ao sistema imune do hospedeiro. Esse parasita possui em sua superfície um revestimento protetor composto por glicoproteínas denominadas VSGs (*Variant Surface Glycoprotein*). Ao longo da infecção, os parasitos trocam periodicamente o tipo

de VSG expresso, o que possibilita a evasão do sistema imune direcionado contra o VSG anterior, prolongando a infecção. O parasita expressa por vez um tipo de VSG que se encontra em regiões denominadas sítios de expressão ativa e se localizam próximo aos telômeros. Além do VSG expresso, há cerca de  $10^7$  VSGs inativos que são encontrados em regiões internas dos cromossomos. Um dos mecanismos responsáveis pela troca de VSG é a recombinação que possibilita a translocação de um VSG inativo para o sítio de expressão ativa (revisado em Machado *et al*, 2006). McCulloch e Barry (1999) demonstraram que a inativação de Rad51 reduz a frequência da troca de VSGs, indicando que Rad51 catalisa ou regula a variação antigênica. Recentemente, foram identificadas mais cinco proteínas relacionadas a Rad51 em *T. brucei*: DMC1, Rad51-3, Rad51-4, Rad51-5, Rad51-6. Nesse estudo, duas dessas proteínas (Rad51-3 e Rad51-5) foram caracterizadas. Foi visto que Rad51-3 contribui para a troca de VSG, dado que seu nocaute diminui a frequência desse mecanismo. Além disso, nocautes dos genes Rad51-3 e Rad51-5 aumentam a sensibilidade dos parasitos ao metilmetanosulfonato (MMS) e diminuem o número de focos de Rad51 formados após o tratamento com fleomicina. Esses resultados indicam a contribuição desses genes para o reparo de DNA e para a recombinação homóloga (Proudfoot & McCulloch, 2005).

## **V. Reparo de DNA e recombinação em *T. cruzi***

Pesquisas na literatura revelam que poucos genes envolvidos no reparo de DNA vêm sendo caracterizados em *T. cruzi*. O primeiro gene descrito envolvido nesse processo codifica para a AP endonuclease. Essa enzima é

capaz de reparar sítios apurínicos/apirimidínicos gerados espontaneamente, por ação de agentes químicos ou pela ação de DNA glicosilases (Perez *et al*, 1999).

O gene MSH2, um homólogo do gene MutS de bactérias, é um dos genes descritos em *T. cruzi* (Augusto-Pinto *et al*, 2001). O gene TcMSH2 está envolvido na via de reparo por erro de pareamento e exhibe polimorfismos entre as subpopulações de *T. cruzi*. Esses polimorfismos refletem em diferentes isoformas da proteína que possuem variabilidade na eficiência do reparo de DNA. Essa característica pode resultar em distintas taxas de mutações entre várias cepas (Augusto-Pinto *et al*, 2003).

Outro gene caracterizado é o gene que codifica para a Uracil DNA glicosilase (UDGase) (Farez-Vidal *et al*, 2001). A UDGase é uma enzima do reparo por excisão de base especializada na remoção de uracilas incorporadas erroneamente durante a replicação ou provenientes da desaminação de citosinas (Farez-Vidal *et al*, 2001). Além desses genes, o L1Tc retrotransposon não-LTR codifica para a endonuclease NLT1c. A superexpressão dessa enzima pode reduzir em até 60% os danos causados ao DNA do *T. cruzi* pela droga daunorubicina (Olivares *et al*, 2003).

Com o projeto genoma de *T. cruzi* foi possível identificar vários genes que codificam para enzimas de reparo, indicando que o genoma desse parasita parece ser capaz de codificar para a maioria das vias de reparo (El Sayed *et al*, 2005). Grande parte dos componentes do reparo por excisão de base, excisão de nucleotídeos e erro de pareamento foram conservados nesse parasita. No

entanto, somente metade das DNA glicosilases descritas em outros organismos foram encontradas. Quanto à recombinação, alguns genes estão ausentes, incluindo o gene Rad52 descrito como crítico para a recombinação homóloga em *S. cerevisiae*. Por outro lado, vários componentes do reparo por NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) também não foram encontrados (El Sayed *et al*, 2005).

Pouco se sabe sobre o mecanismo de recombinação homóloga em *T. cruzi*. No entanto, a recombinação possivelmente possui um papel relevante na biologia do parasita através da homogeneização dos alelos e na formação de híbridos (revisado em Machado *et al*, 2006). Recentemente, nosso grupo descreveu e caracterizou a proteína Rad51 de *T. cruzi*. Essa proteína apresenta domínios de ligação ao DNA e ao ATP, como demonstrado em Rad51 de outros organismos. A expressão de TcRad51 é detectada nas três formas do ciclo de vida do parasita, com níveis de mRNA duas vezes mais abundante na forma amastigota. A atividade recombinase do produto desse gene foi verificada pelo aumento de eventos de recombinação observadas em células de mamífero expressando TcRad51 e contendo duas cópias inativas do gene de resistência a neomicina. Além disso, como essa proteína é componente do reparo por quebra dupla, esse parasita foi submetido à radiação ionizante. Dessa forma, quando exposto à radiação gama, diferentes cepas do parasita conseguem sobreviver cerca de 50% a doses relativamente altas como 1KGy (figura 4). Essa dose é cerca de 50 a 100 vezes maior que a quantidade necessária para matar metade de outros eucariotos como plantas (Jiang *et al*, 1997), células de mamífero (Vispe *et al*, 1998; Yanez & Porter, 1999) e o

parasita *Plasmodium* (Geoghegan *et al*, 2001). Uma outra indicação do papel de TcRad51 nesse processo foi evidenciado pelo aumento da expressão do seu mRNA após a irradiação (Regis-da-Silva *et al*, 2006).

Tendo em vista esses dados, planejamos experimentos que nos permitissem compreender melhor o processo de recombinação em *T. cruzi*. Esse mecanismo pode estar envolvido no reparo de danos ao DNA como também na geração de variabilidade dentro da população desse parasita.

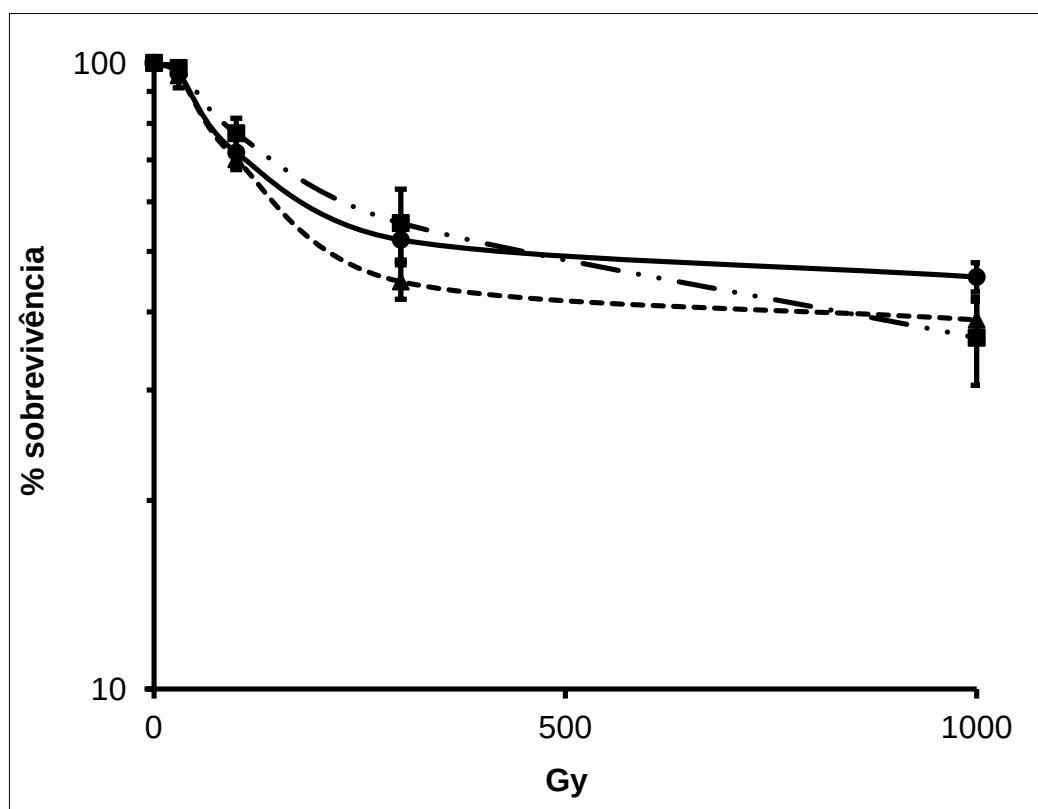


**Figura 4: Curva de sobrevivência de *T. cruzi* à radiação gama.**

Epimastigotas das cepas CL Bener (círculo), JG (triângulo) e Colombina (quadrado) foram submetidas a diferentes doses de radiação gama (500 Gy e 1000 Gy). A porcentagem de parasitos sobreviventes foi determinada no quinto dia após a irradiação (Regis-da-Silva *et al*, 2006).

## Objetivos

O objetivo geral desse trabalho é estudar o envolvimento do gene Rad51 no processo de recombinação em *T. cruzi*.

Para tanto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Obter linhagens de *T. cruzi* (população e clones) superexpressando o gene TcRad51 em *T. cruzi*;
- Avaliar a recuperação dos parasitos superexpressores de TcRad51 após a exposição a agentes que causam quebras duplas como a zeocina e a radiação gama;
- Analisar a cinética de reparo de DNA através da análise do perfil apresentado pelo DNA das células selvagens e superexpressando TcRad51 após a exposição à radiação gama;
- Verificar o envolvimento da superexpressão de Rad51 na integração de DNA exógeno no genoma do parasita.

## Material e Métodos

### I. Cultura de *Trypanosoma cruzi* e transfecção

Epimastigotas da cepa CL Brener foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptone - liver digest neutralized* 5g/L, NaCl 4g/L, bactotriptose 5g/L, KCl 0,4g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8g/L, dextrose 2g/L, hemin 0,2% 10ml em NaOH 0,05M, pH 7,3) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e os antibióticos penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Invitrogen). A cultura foi mantida a 28°C em frascos apropriados e em sua fase exponencial de crescimento, através de repiques semanais. Para contagem do número de parasitos, esses eram diluídos em PBS (0,15 M pH 7,2) e eritrosina (4% em PBS) e posteriormente, os parasitos vivos eram contados em câmara citométrica. Para transfecção, esses parasitos foram centrifugados, lavados uma vez com PBS, e posteriormente ressuspensos em tampão para eletroporação (75% EPB (Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7 mM, Glicose 6 mM) + 25% Citomix (KCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, Hepes 25 mM, EDTA 2mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM)) para uma concentração final de 10<sup>8</sup> parasitos/ml. Em uma alíquota de 0,4 ml dessa suspensão de células foram adicionados 50 µl de plasmídeo (1 µg/µl) e em outra alíquota foram adicionados 50 µl de TE (EDTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM pH 8,0). Essas alíquotas foram então transferidas para cuvetas de 0.2-cm, e após 15 min no gelo, essas foram eletroporadas através do *Bio-Rad gene pulser*. As condições elétricas foram de 0,3 KV, capacitância 500 µF, tendo sido aplicados 3 pulsos, com intervalo de 10 segundos entre eles.

Após a eletroporação, as cuvetas permaneceram a temperatura ambiente por 10 minutos e os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 ml de meio LIT suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino) e estreptomicina/penicilina e mantidos a 28 °C. Quatro dias após à eletroporação, 200 µg/ml de higromicina foi adicionado ao meio (Invitrogen) das duas culturas. Durante um mês, as culturas transfectadas e eletroporadas na ausência de plasmídeo foram cultivadas em LIT contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), os antibióticos penicilina e streptomicina (200 µg/ml), além da higromicina a uma concentração final de 200 µg/ml. Após a seleção, a cultura transfectada permaneceu sendo mantida na presença de higromicina.

## **II. Seleção e análise de clones transfectados**

Para obtenção de clones da cultura de parasitos superexpressando Rad51, essas células foram plaqueadas em placas de ágar sangue. As placas utilizadas continham o antibiótico higromicina. Os parasitos foram plaqueados em um volume de 100µl em diferentes placas e cada uma contendo  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  parasitos. Após 20 dias de seleção, os clones obtidos foram transferidos para 1ml de meio LIT. Após uma semana, os clones que cresceram foram transferidos para 3ml de meio LIT, e posteriormente para 5ml.

Para a curva de crescimento, os clones superexpressando TcRad51, que estavam crescendo em sua fase exponencial, foram contados através de câmara citométrica e diluídos para uma concentração de  $8 \times 10^5$  parasitos/ml. Posteriormente, de dois em dois dias, eles eram contabilizados através de câmara citométrica.

### III. Clonagem e obtenção dos plasmídeos

Os vetores de interesse foram digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI* ou com a enzima *NotI*, a 37°C por 16 h utilizando tampão D (Promega). Uma alíquota dos vetores digeridos foi corrida em eletroforese utilizando gel de agarose 1% em TAE (20mM Tris-Acetato, 0,5 mM EDTA pH 8,0) juntamente com padrão de peso molecular 1 Kb DNA ladder (*Invitrogen*), para análise da digestão.

O volume total dos vetores digeridos com *XbaI* e *XhoI* foram aplicados em um gel de agarose 1% para eletroforese. As bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram purificados utilizando o *Kit Concert™ Rapid Gel Extraction System* (*Life Technologies*), conforme especificação do fabricante.

O vetor digerido com *NotI* foi precipitado com isopropanol (volume 1:1) e acetato de sódio 3 M (0,1 volume) por 16 horas a - 20°C. Essa reação foi centrifugada (13000 rpm por 15 min à 4°C), enxaguada com etanol 70% e ressuspensa em TE.

Os fragmentos de interesse foram ligados através da enzima T4 DNA ligase em seu tampão (*Invitrogen*) por 16 horas à 4°C.

Os produtos da ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  (*F'**endA1 hsdR17 supE44 thi1-1 gyrA relA1  $\Delta$ (lacIZYA-argF)U169deoR RecA*) através de eletroporação de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook e colaboradores (1989).

Os clones transformados foram verificados quanto à presença de inserto através da PCR utilizando-se os seguintes iniciadores para Rad51:

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| Rad51Xbal | 5' TCT AGA ATG AAC ACC CGC TCC AAG AG 3'      |
| Rad51XhoI | 5' CTC GAG TAG ATC AAT CCC TTG CAT CCC CAA 3' |

Para essa amplificação, foram realizados 35 ciclos de amplificação, variando entre as temperaturas 94°C, 52°C e 72°C por 55 segundos cada. Em seguida, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos do clone selecionado foram extraídos utilizando o *Kit Wizard Maxi Prep* (Promega), conforme especificação do fabricante. Posteriormente, os plasmídeos foram analisados em gel de agarose 1% e quantificados através de leitura em espectrofotômetro.

#### **IV. Extração de RNA total de *T. cruzi* e northern blot**

O RNA total das culturas selvagem e transfectada foi obtido através da extração do RNA de  $5 \times 10^8$  parasitos, utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as indicações do fabricante. O RNA extraído, juntamente com o tampão de amostra, foi incubado por 15 min a 65 °C e posteriormente, incubado em gelo e acrescido 1µl de brometo de etídio (1,0 mg/ml). Essa mistura foi aplicada em gel de agarose 0,8% contendo MOPS 1x (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e 2% de formaldeído. Esse gel foi corrido em MOPS 1X a 100 V por tempo adequado. Após a corrida, o gel foi analisado em transluminador de UV (Ultravioleta), para averiguação da

integridade do RNA. Para a quantificação do RNA, foi utilizada a leitura em espectrofotômetro na OD 260.

Após a quantificação descrita acima, 15 µg de cada RNA extraído, tampão de amostra (0,75 ml de formamida, 0,15 ml de MOPS 10x, 0,24 ml de formaldeído, 0,1 ml água DEPC, 0,1 ml de glicerol e 0,08 ml de azul de bromofenol a 10%), mistura aquecida a 65°C por 15 minutos, juntamente com o brometo de etídio (50 µg/ml) foram aplicados em gel de agarose 0,8% contendo MOPS 1X e formaldeído 2%. Após a corrida, o gel foi analisado em transluminador de UV para análise do RNA aplicado. O gel foi tratado por duas vezes de 20 minutos com SSC 10X (NaCl 1,5 M, citrato trissódico.2H<sub>2</sub>O 0,15 M pH 7,0). Os RNAs foram transferidos para membrana *Hybond-N* (Amersham) por capilaridade em solução SSC 10X por 24 horas, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

As membranas foram então submetidas à radiação ultravioleta em um aparelho UV *Crosslinker Fisher Biotech*, enxaguadas brevemente em solução SSC 2x, secas à temperatura ambiente e armazenadas em geladeira até o momento da hibridação com sondas de DNA.

#### **IV.1. Hibridação e marcação da sonda.**

O fragmento do gene Rad51 foi marcado radioativamente para a posterior hibridação na membrana obtida. A marcação da sonda foi realizada utilizando o *Kit MegaPrimer* (Amersham). Foi utilizado 40 ng do fragmento, citosinas marcadas na fosforila α com o isótopo P<sup>32</sup> (α-<sup>32</sup>P [dCTP]) (Amersham), além dos componentes do *MegaPrimer* que são: a DNA

polimerase *Klenow*, iniciadores aleatórios, e uma mistura de nucleotídeos sem citosina, em um volume final de 50 µl. Os iniciadores e o DNA são fervidos por 5 min antes da adição dos outros componentes. Após esse passo, a reação é incubada a 37°C por 20 min e depois interrompida pela adição de EDTA 0,2 M. O DNA marcado foi, então, purificado em uma *Nick Column* (Amersham bioscience), conforme especificação do fabricante.

Após a obtenção das sondas, as membranas foram submetidas à pré-hibridação em aproximadamente 30 ml de solução de pré-hibridação ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,25 M, SDS 7%, BSA 1% e EDTA 1 mM) em frascos apropriados mantidos em fornos giratórios a 65°C por 1 hora. Após prévia desnaturação por fervura, as sondas marcadas foram adicionadas a 10 ml de solução de pré-hibridação. Para a hibridação, as membranas foram expostas a essa solução e foram mantidas a 65°C por aproximadamente 18 horas (Church & Gilbert, 1984).

Após hibridação, as membranas foram enxaguadas com solução de lavagem (SSC 2X e SDS 0,2%) a temperatura ambiente e a 65°C, duas vezes por 15 minutos em grandes volumes da mesma solução em cada temperatura, em forno giratório.

As membranas foram expostas a filmes de raios-X (KODAK) por dois dias. Os filmes foram revelados usando solução reveladora (KODAK) até o aparecimento de bandas, depois foram enxaguadas em água e imersos em solução fixadora (KODAK) por cerca de cinco minutos.

Os filmes de raio-X foram analisados em um software denominado *Photocapt* (Lourmat) para a realização da densitometria da intensidade das

bandas reveladas. Os gráficos foram feitos a partir dos dados das intensidades das bandas das diferentes culturas em relação a cultura selvagem.

## **V. Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)**

A cultura de *T. cruzi*, em fase exponencial, foi centrifugada a 3000 RPM por 10 min a temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas cuidadosamente em PBS. Após novo ciclo de lavagem, as células foram ressuspensas em PSG (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 75 mM, NaCl 60 mM e Glicose 10%), a uma concentração de  $5 \times 10^7$  parasitos por 50 µl. Igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - *Low Melting Point*) 1%, à temperatura de aproximadamente 40°C, foi acrescida à suspensão de parasitos. Após homogeneização, essa mistura foi distribuída em moldes com volume de 100 µl com concentração final de parasitos de  $5 \times 10^7$ .

Após solidificação, cerca de 20 min à 4°C, os blocos foram mergulhados em um grande volume de solução ESP (EDTA 0,5 M, Lauroyl sarcosine 1% e Proteinase K 0,5 mg/ml), e mantidos por 48 horas a 50°C sob agitação lenta. Após lavagem em EDTA 0,5 M pH 8,0, os blocos foram armazenados a 4°C nesta solução até o momento da eletroforese (Engman *et al*, 1987).

As bandas cromossômicas dos parasitos foram separadas através de eletroforese de campo pulsátil (PFGE - *Pulse Field Gel Electrophoresis*) conforme descrito por Cano e colaboradores (1995), com algumas modificações (Freitas, 2003).

Os blocos contendo moléculas de DNA dos parasitos foram submetidos ao PFGE ao lado de um padrão comercial de peso molecular (cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*, New England). Esses blocos foram aplicados em gel de agarose 0,8% (BioRad) em TBE 0,5X (Tris-borato 45,5 mM e EDTA 1 mM). Esse gel foi submetido à eletroforese de campo pulsátil em um aparelho *GeneNavigator* (Amersham Pharmacia) em tampão TBE 0,5X, sob temperatura constante de 8,2°C (modificado a partir de Cano *et al*, 1995).

A eletroforese consistiu em pulsos de 90 segundos em cada direção (N/S e E/W) por 30 horas, 120 seg durante 30 h, 200 seg por 24h e 350 seg por 25h, 800 seg por 26h totalizando 135 horas a 83V (modificado a partir de Cano *et al*, 1995).

Após a corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio 1% e fotografados através de um aparato digital Vilber Luormat DP-001. Posteriormente, foi utilizado o software *Photocapt* para a realização da densitometria da intensidade das bandas que está representada como gráficos abaixo da respectiva canaleta do gel.

## **VI. Transferência de *Southern blot***

Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma solução de depurinação (HCl 0,25 M) por 30 minutos, seguidos por solução de desnaturação (NaOH 0,5 M e NaCl 0,5 M) por 30 minutos e solução de neutralização (Tris-base 1 M, NaCl 0,5 M e SSC 2x) por 40 minutos.

A transferência para membrana *Hybond-N* (Amersham) foi realizada através de aparato de transferência por capilaridade por 24 horas em solução de SSC 10x conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

As membranas foram então submetidas a radiação ultravioleta em um aparelho UV *Crosslinker Fisher Biotech*, enxaguadas brevemente em solução SSC 2x, secas à temperatura ambiente e armazenadas em geladeira até o momento da hibridação com sondas de DNA.

A obtenção e marcação de sondas, e o *blotting* foram realizados conforme descrito anteriormente para a técnica de *northern blot*.

## **VII. Ensaios utilizando tratamento com agentes genotóxicos**

Epimastigotas da cultura selvagem e transfectadas com Rad51 foram crescidas em meio LIT em sua fase exponencial de crescimento. Após a determinação da densidade de parasitos por contagem em câmara citométrica, o meio contendo parasitos foi diluído para uma concentração de  $10^7$  parasitos/ml.

Para o ensaio de tratamento com zeocina, antibiótico da família da bleomicina, os parasitos foram distribuídos em alíquotas de 2 ml em placas contendo seis poços e mantidos em câmara úmida. As culturas foram expostas a doses de 64  $\mu$ l/ml e 640  $\mu$ l/ml de zeocina (Invitrogen). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após cinco dias de exposição a esse antibiótico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. Foi realizado uma curva de sobrevivência com os valores obtidos.

Para o ensaio com radiação gama, os parasitos foram distribuídos em alíquotas de 5 ml em garrafas de cultura. Essas culturas foram submetidas a doses de 200 Gy, 500 Gy e 1000 Gy de radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ), disponível no CDTN/UFMG. Essas doses foram obtidas através da exposição a uma taxa de 1578 Gy/h por 8 min, 19 min e 38 min, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e sob a supervisão do técnico Ricardo Ferracini.

Após a irradiação, em tempos determinados, os parasitos foram contados em câmara citométrica. A concentração dos parasitos dessas culturas foi contabilizada de um dia até vinte dias após a irradiação.

### **VIII. Ensaio de recombinação**

As culturas controle e superexpressando Rad51 foram transfectadas, conforme descrito anteriormente, com o plasmídeo pROCKGFPNeo linearizado com a enzima *NotI*. Os parasitos transfectados com esse plasmídeo foram plaqueados em placas de ágar sangue.

Essas placas são feitas utilizando 0,75% de agarose LMP diluída em PBS pH 7,4, 48,4% de BHI (*Brain Heart Infusion*), 48,4% de LIT (contendo soro fetal, estreptomicina/penicilina e o antibiótico desejado para seleção) e 2,5% de sangue. O sangue é inicialmente desfibrinado através da sua agitação por dez minutos em um *erlenmeyer* contendo pérolas de vidro, que formarão um grumo que deve ser retirado. O sangue, então, deve ser inativado, aquecendo-o a 56°C por 30 min. A sua adição deve ocorrer lentamente e após a mistura do BHI, do LIT e do ágar que devem estar a 45-50°C. Depois da homogeneização,

a mistura é adicionada em placas de vidro que solidificarão após o contato com gelo. As placas devem ficar por dois dias a 37°C, antes de serem utilizadas.

Os parasitos transfectados com pROCKGFPNeo linearizado, tanto as células controle quanto as superexpressoras, foram plaqueados em 100µl contendo  $10^4$  parasitos para duas placas sem antibiótico e contendo  $10^7$  parasitos em duas placas contendo G418. Após 21 dias de seleção, os clones obtidos foram contabilizados e verificados quanto à presença de GFP através da análise das células em microscópio de fluorescência.

## Resultados

### I. Obtenção do vetor para superexpressão de TcRad51

Vários estudos demonstraram o papel da recombinação na recuperação de lesões no DNA, principalmente de quebras de fita dupla (revisado em Symington, 2002). Para investigar esse mecanismo em *T. cruzi*, nós optamos, inicialmente, por estudar a superexpressão do gene TcRad51, o qual foi descrito em outros organismos como um dos principais genes envolvidos na recombinação.

Para construção do plasmídeo que possibilitasse a superexpressão do gene TcRad51 foi utilizado o vetor pROCKGFP<sub>higro</sub> desenvolvido por DaRocha e colaboradores (2004b) (Figura 5). Esse vetor possui uma região com homologia ao gene da  $\beta$ -tubulina que possibilita a integração desse vetor no genoma do parasita. O promotor ribossômico presente nesse plasmídeo possibilita a expressão dos genes que codificam para as proteínas fluorescente verde GFP e da resistência ao antibiótico higromicina. Além disso, a presença de regiões 5'UTR de TcP2 $\beta$ , 3'UTR e região intergênica de GAPDHII auxiliam no correto processamento do pré-mRNA e também na estabilidade do mRNA maduro.

Com o objetivo de substituir o gene que codifica para GFP pelo gene TcRad51, foi realizada uma digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I. Através de eletroforese em gel de agarose 1%, verificou-se a digestão do

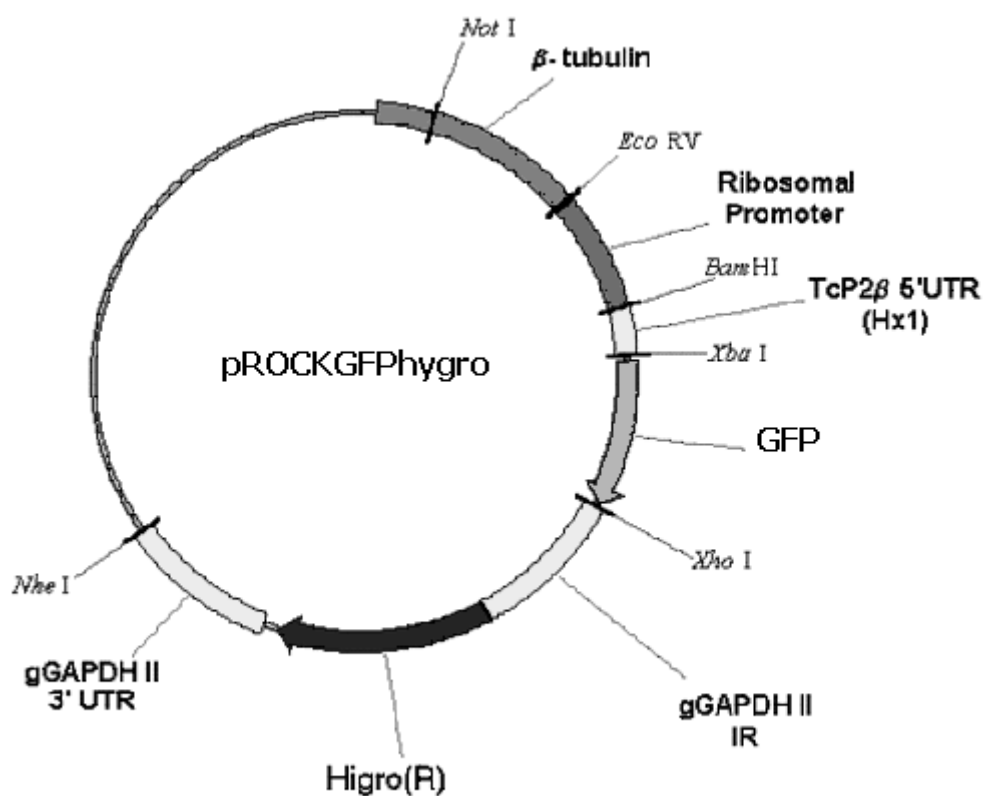


**Figura 5: Representação do plasmídeo pROCKGFPPhygro.** Esse plasmídeo possui região com homologia ao gene da  $\beta$ -tubulina, além de um promotor ribossômico e regiões 5'UTR de TcP2 $\beta$ , 3'UTR e região intergênica de GAPDHII que auxiliam na expressão das proteínas GFP e da resistência a higromicina (DaRocha *et al*, 2004b).

plasmídeo em fragmentos de tamanhos esperados: 6955pb e 717 pb (dado não mostrado). O maior fragmento, correspondente ao plasmídeo pROCKGFPHygro digerido, foi purificado.

O plasmídeo pCR®2.1-TOPO onde estava clonado um fragmento de 1116 pb correspondente ao gene TcRad51 de *T. cruzi* (gentilmente cedido por Carlos Gustavo - Silva, 2002) foi digerido para obtenção do gene TcRad51. A digestão foi realizada simultaneamente com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*. Através de eletroforese em gel de agarose 1%, foi possível visualizar duas bandas com tamanhos esperados: 1100 pb e ~4000pb (dado não mostrado). Os produtos da digestão foram aplicados em um gel de agarose 1% e o fragmento de 1116 pb correspondente ao TcRad51 foi purificado.

O fragmento contendo o gene TcRad51 e o plasmídeo pROCKGFPhygro digerido com *XbaI/XhoI* foram ligados com a enzima T4 DNA ligase e os produtos dessa ligação foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Três clones transformantes obtidos foram analisados quanto à presença de inserto através de PCR utilizando-se iniciadores para TcRad51. O DNA das colônias 2 e 3 geraram produtos de amplificação de tamanhos esperados (Figura 6). Por esse motivo, extraímos os plasmídeos provenientes da colônia dois. Para obtenção de grandes quantidades de plasmídeos para transfecção em *T. cruzi*, foi feita uma purificação a partir de 300 ml de cultura pela técnica de *Maxi Prep* (Promega).

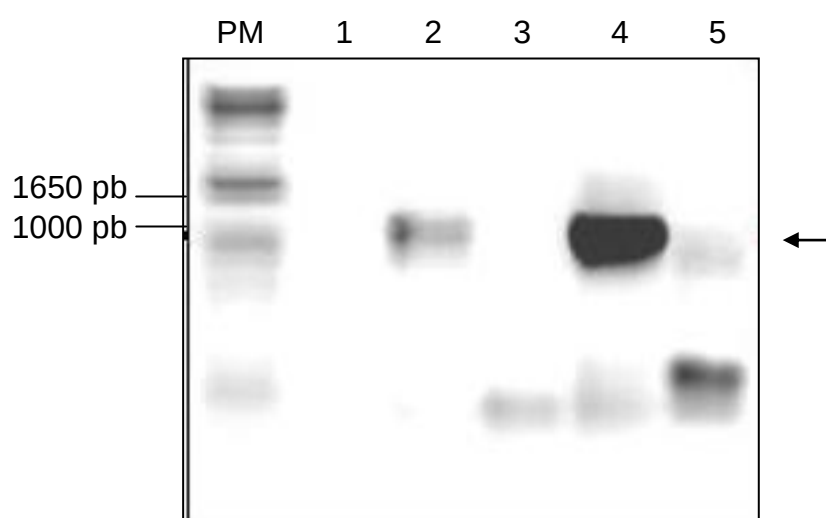


**Figura 6. Gel de agarose corado com brometo de etídeo contendo os produtos da PCR de colônias transformadas com a ligação contendo pROCKGFPhygro e TcRad51. PM: Padrão de peso molecular 1Kb, 1: controle negativo, 2: pCR®2.1-TOPO-Rad51, 3: colônia 1, 4: colônia 2, 5: colônia 3. A seta mostra o fragmento que contém TcRad51 e as linhas mostram as bandas correspondentes no padrão de peso molecular 1 KB DNA *plus*.**

O plasmídeo obtido foi digerido utilizando a enzima de restrição *NotI* para a sua linearização, e em seguida submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

## **II. Transfecção e obtenção de linhagens de *T. cruzi* superexpressando TcRad51**

Os plasmídeos linearizados foram utilizados para transfecção por eletroporação de culturas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL Brener cultivadas em meio LIT em fase exponencial de crescimento. Após a eletroporação, as culturas transfectadas com TcRad51 e eletroporadas na ausência de plasmídeo (*Mock*) foram mantidas sob seleção em meio LIT contendo higromicina (200 µg/ml). Após um mês de seleção, nenhum parasita foi detectado na cultura denominada *Mock*, enquanto os parasitos da cultura transfectada com TcRad51 mantiveram seu crescimento. Esse resultado indica a provável incorporação do vetor contendo os genes de resistência a higromicina e conseqüentemente de TcRad51 pelos parasitos transfectados.

### **II.1. Análise da integração de TcRad51 exógeno no genoma dos parasitos transfectados**

Para verificar se ocorreu a integração do TcRad51 exógeno no genoma dos parasitos transfectados, foi realizado um PFGE com o DNA extraído a partir das culturas selvagem e superexpressando TcRad51. O gel obtido foi corado com brometo de etídeo para a visualização de bandas cromossômicas, sendo estas, posteriormente, transferidas para uma membrana e hibridadas

com sonda de TcRad51 (Figura 7B). Verificou-se a presença de uma banda correspondente ao TcRad51 endógeno em ambas as culturas cujo tamanho é de aproximadamente 1,2 Mb (figura 7A) como também mostrado no trabalho de Freitas (2003). Na cultura transfectada, observou-se ainda uma segunda banda correspondente ao TcRad51 exógeno, indicando a integração desse fragmento no genoma do parasita em uma banda cromossômica de aproximadamente 1,8 Mb. Além disso, a intensidade da banda exógena de TcRad51 é duas vezes menor que a intensidade da banda endógena apresentada pela cultura transfectada (Figura 7A).

## **II.2. Análise do mRNA dos parasitos transfectados**

Para confirmar que o gene TcRad51 transfectado estava transcricionalmente ativo, realizamos a extração do RNA seguida da técnica de *northern blot*.

O RNA total das culturas de CL Brener selvagem e da cultura transfectada com o gene TcRad51 foi extraído utilizando *RNeasy Mini Kit* (Quiagen). Após a averiguação da integridade do RNA extraído, as amostras de RNA da cultura selvagem e transfectada com Rad51 foram corridas em gel de agarose desnaturante e transferido para membrana de náilon para posterior hibridação com sonda para TcRad51.

A sonda para TcRad51 foi obtida através da digestão do plasmídeo pCR®2.1-TOPO contendo TcRad51 com as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI*, seguida da purificação deste inserto (1116 pb). Após a hibridação, a membrana foi exposta a um filme de raio X (Figura 8A e B). A análise da figura evidenciou

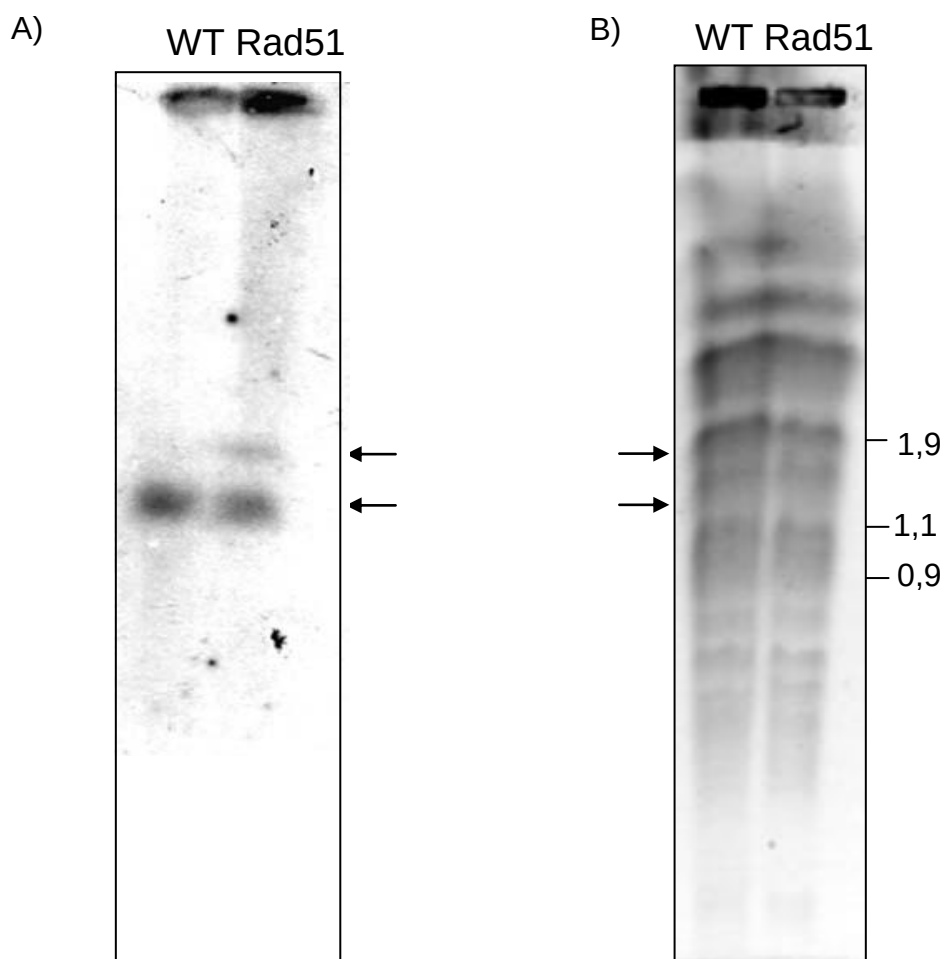


**Figura 7: PFGE de DNA extraído de *T. cruzi* selvagem (WT) e transfectado com TcRad51 (Rad51).** A) *Southern blot* através da hibridação com sonda para TcRad51. B) PFGE de DNA corado com brometo de etídeo mostrando as bandas cromossômicas das culturas selvagem e superexpressora. As linhas mostram os locais das bandas do padrão de peso molecular de *S. cerevisiae* (PM) e seus respectivos tamanhos em megabases. A seta superior mostra a posição do TcRad51 exógeno e a seta inferior mostra a posição do TcRad51 endógeno.

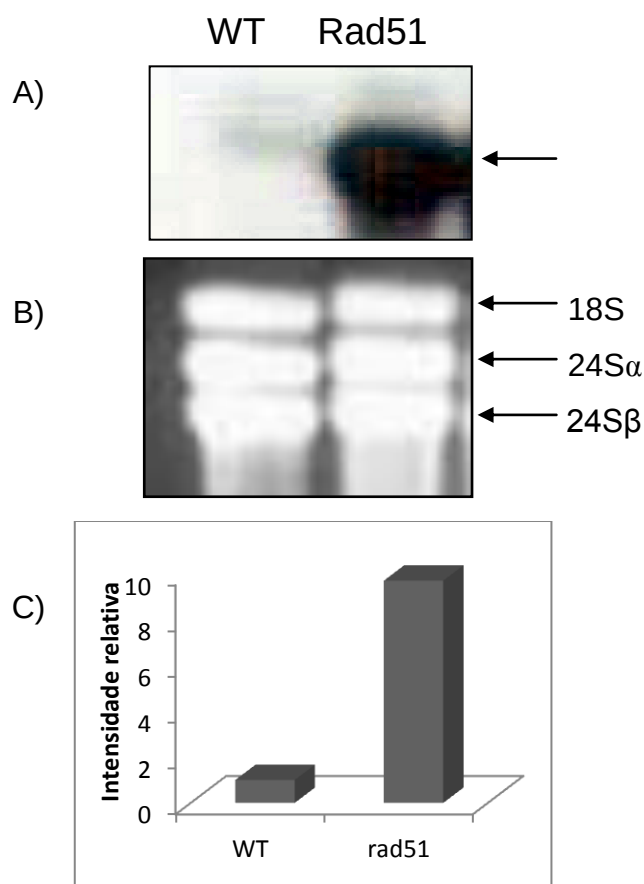


**Figura 8: Northern blot de TcRad51.** A) Hibridação com sonda de TcRad51 do RNA total das culturas selvagem (WT) e transfectada com TcRad51 (Rad51). A seta mostra a posição de TcRad51. B) Gel de agarose corado com brometo de etídio contendo 15  $\mu$ g do RNA total extraído de cultura de CL Brener selvagem (WT) e transfectada com TcRad51 (Rad51). As setas mostram a posição dos rRNA. C) Gráfico de intensidade de bandas relativa à intensidade da banda de TcRad51 da cultura selvagem quantificadas através de densitometria.

uma banda de 1700 pb de tamanho correspondente ao mRNA de TcRad51. A análise densitométrica normalizada das bandas indica que a cultura transfectada com TcRad51 apresenta níveis de expressão de TcRad51 cerca de dez vezes maior que a cultura selvagem (Figura 8C).

### **III. Tratamento dos parasitos superexpressando TcRad51 com agentes genotóxicos que causam quebras de fita dupla do DNA.**

#### **III.1. Tratamento com zeocina**

Com o objetivo de verificar se a superexpressão de TcRad51 leva a uma maior eficiência na recuperação de *T. cruzi* após a indução de quebras de fita dupla em seu DNA, foram realizados ensaios utilizando o antibiótico genotóxico zeocina. Para tanto, curvas de sobrevivência de culturas de parasitos selvagem e superexpressando TcRad51 (Figura 9) expostas a duas concentrações de antibiótico (64 µg/ml e 640 µg/ml) foram realizadas. O perfil da curva dos parasitos superexpressando TcRad51 mostra que em ambas concentrações foi observada maior resistência a esse antibiótico desses parasitos em relação aos parasitos selvagens. Esse resultado indica que a superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência a esse antibiótico, provavelmente, através do reparo de quebras de fita dupla no DNA.

#### **III.2. Irradiação de *T. cruzi* superexpressando TcRad51**

Como segunda estratégia para verificar se a superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência a agentes que causam quebras de fita dupla de DNA, foi realizado um ensaio utilizando radiação gama. Nesse ensaio foi realizado uma curva de crescimento de células selvagens e células

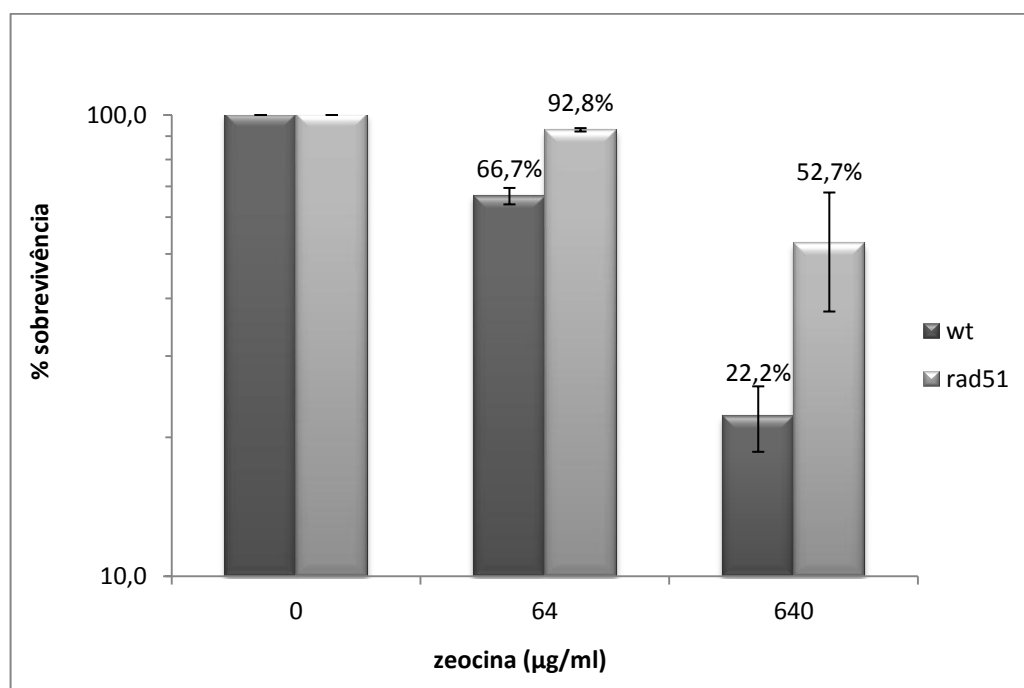


**Figura 9: Curva de sobrevivência de *T. cruzi* selvagem (WT) e transfectado com TcRad51 (Rad51) submetidos a zeocina nas doses de 64 e 640ug/ml.** As células tratadas com zeocina foram contadas após o quinto dia na presença da droga juntamente com as células não tratadas. Os valores aqui mostrados correspondem à média de uma triplicata.

superexpressando TcRad51 expostas à radiação gama em três diferentes doses: 200 Gy (Figura 10A), 500 Gy (Figura 10B e 11) e 1000 Gy (Figura 10C). Verificou-se que as culturas selvagem e transfectada apresentam o mesmo perfil na curva de crescimento na ausência de irradiação, o que indica que a superexpressão do gene TcRad51 não está alterando o crescimento do parasita. Analisando as culturas expostas às doses de 500 Gy e 1000 Gy (Figura 10B e 10C), observa-se inicialmente uma redução no número de parasitos em todas as culturas. Além disso, os parasitos sobreviventes de ambas as culturas não se dividem durante um período inicial variável (Figuras 10 B e 10C). A retomada do crescimento dos parasitos superexpressores ocorre antes que a dos parasitos selvagens em todas as doses administradas (Figuras 10 e 11). O período desprendido até o início dessa fase de proliferação é proporcional à dose recebida, por exemplo, as culturas submetidas a 200 Gy, menor dose administrada, foram as primeiras a retomarem o crescimento (Figura 10A). Para confirmação desses resultados, a curva referente à dose de 500 Gy foi reproduzida duas vezes (Figura 11). Em conjunto, esses resultados sugerem que a superexpressão de TcRad51 possibilita uma cinética de recuperação mais rápida após o tratamento com irradiação gama e, conseqüentemente, após exposição a agentes que causam quebras de fita dupla.

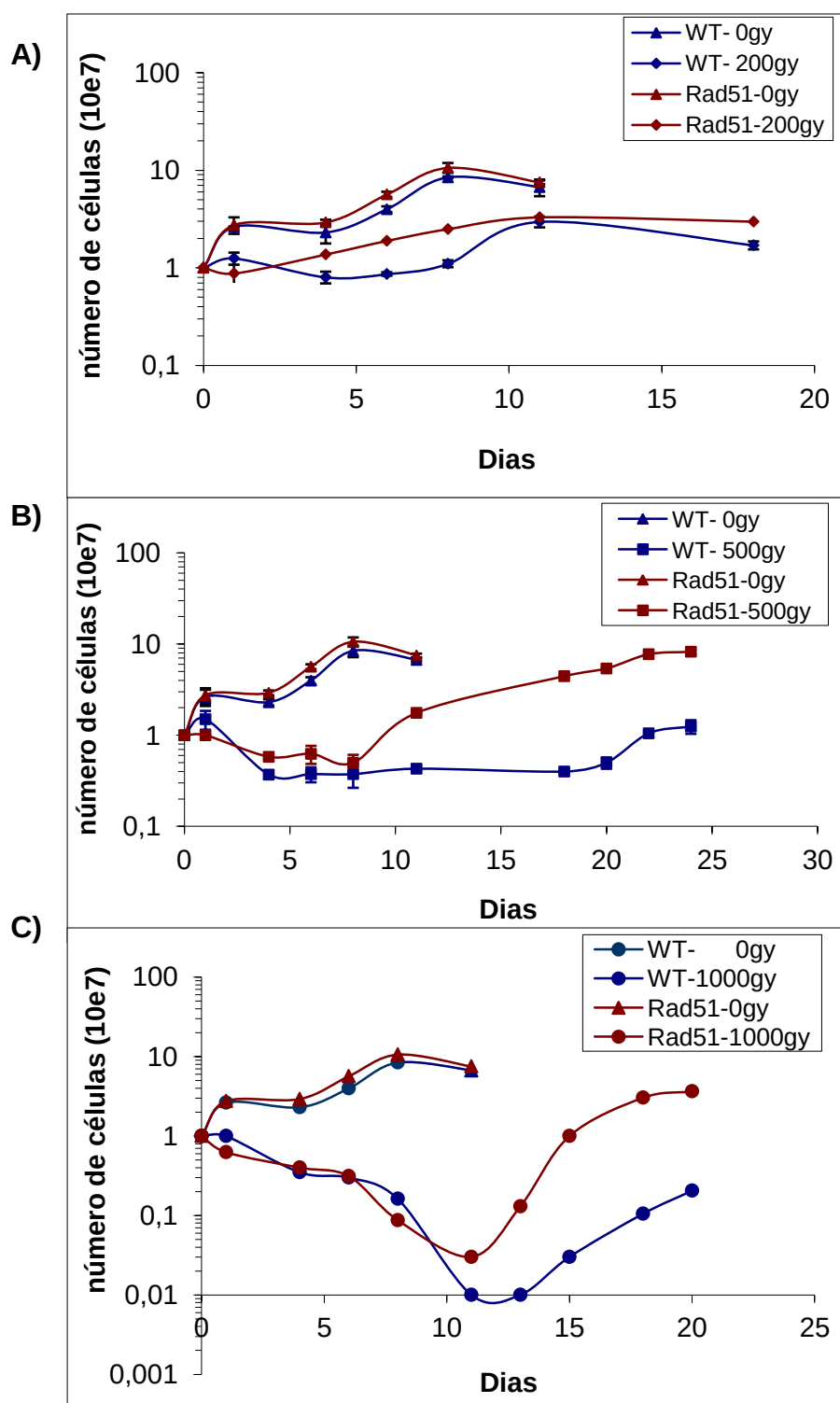


**Figura 10: Curva de crescimento de *T. cruzi* selvagem (WT) e transfectado com TcRad51 (Rad51) irradiados com 0 Gy (A-C), 200 Gy (A), 500 Gy (B) e 1000 Gy (C). Esses parasitos foram cultivados em meio LIT partindo de uma concentração inicial de  $10^7$  parasitos/ml. Os valores mostrados correspondem à média de triplicatas.**

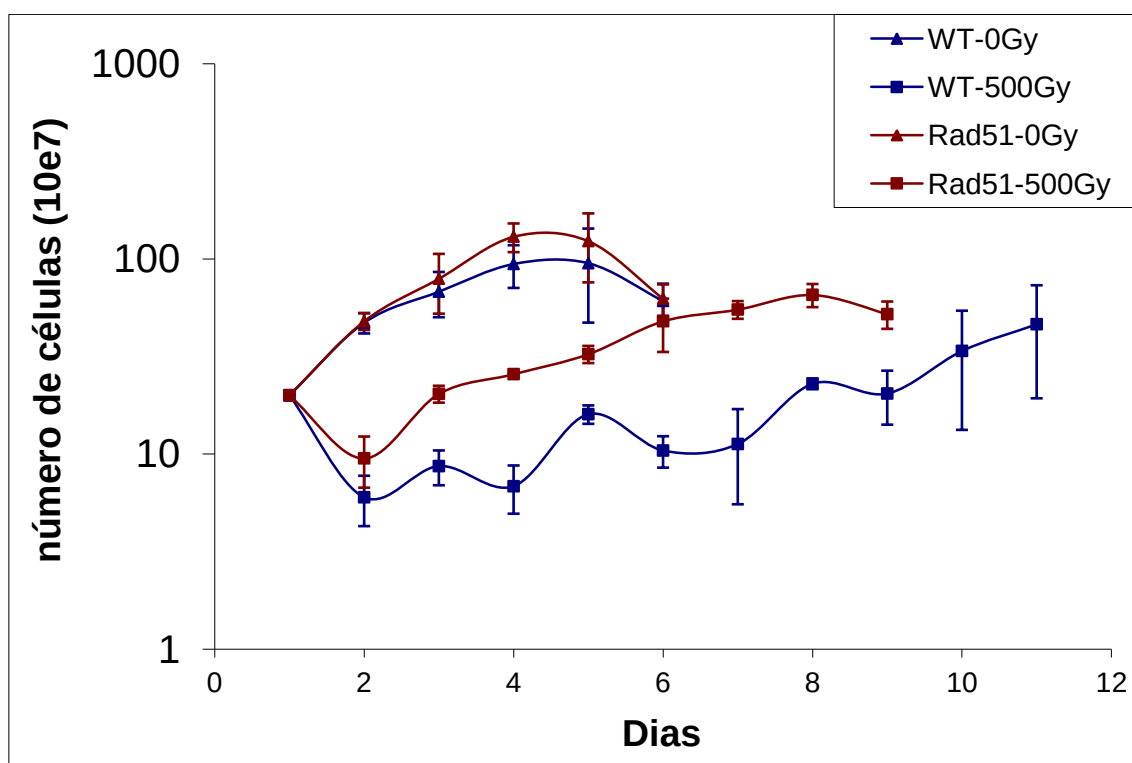


**Figura 11: Curva de crescimento de *T. cruzi* selvagem (WT) e transfectado com TcRad51 (Rad51) irradiados com 0 Gy e 500 Gy.** Esses parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $10^7$  parasitos/ml. Os valores mostrados correspondem à média de triplicatas. O gráfico mostra um dos experimentos realizados.

### III.3. Análise da recuperação do DNA após a irradiação.

Na tentativa de verificar se a maior eficiência de recuperação apresentada pelos parasitos superexpressando TcRad51 após a irradiação está relacionada a uma cinética mais rápida de recuperação das quebras de fita dupla, os padrões de bandas cromossômicas apresentados por essas células superexpressoras e pelas células selvagens após a irradiação foram analisados (Figura 12). Para tanto, foi feita a extração do DNA de culturas de parasitos selvagens e superexpressando TcRad51 não irradiados ou cultivados por 0, 6, 24, 30 e 48 horas após a irradiação, seguida de fracionamento através de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) (Figura 12). Neste ensaio foi utilizada a dose de 500 Gy de radiação gama. A quantificação das intensidades das bandas através de densitometria está representada em forma de gráfico, logo abaixo das respectivas canaletas do gel do PFGE.

Observou-se que as culturas selvagem e superexpressando TcRad51 não irradiadas apresentam um perfil similar de bandas cromossômicas (Figura 12 – 1º painel). Esse perfil é alterado quando se observa o DNA logo após a irradiação, quando ocorre o desaparecimento de bandas de alto peso molecular. Também foi observado o surgimento de um rastro nas duas culturas testadas, o que indica que houve a fragmentação do DNA em fragmentos de baixo peso molecular (Figura 12 – 2º painel). No entanto, quando analisamos as culturas cultivadas por 6 horas após a irradiação, pode-se observar um surgimento discreto de bandas de alto peso molecular somente nas células

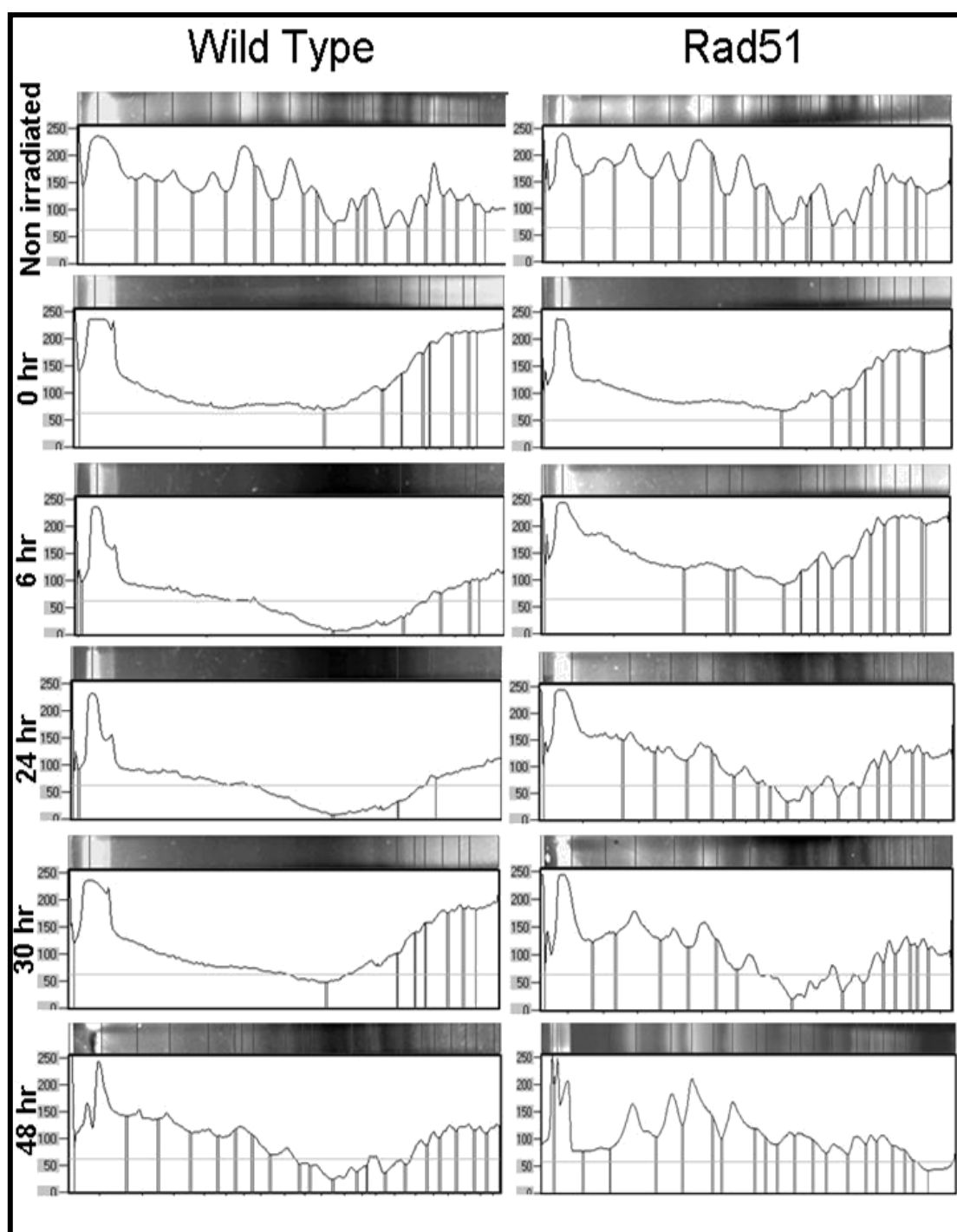


**Figura 12: PFGE do DNA dos parasitos selvagens e superexpressando TcRad51 antes da irradiação e diferentes tempos (0, 6, 24, 30 e 48h) após a exposição a 500 Gy de radiação gama. Para cada canaleta do gel está mostrada a medida da intensidade das bandas (unidades arbitrárias) obtida por densitometria.**

superexpressoras (Figura 12 – 3º painel). Tal fenótipo se torna mais evidente quando analisamos as células cultivadas por 24 horas após a irradiação (Figura 12 – 4º painel). Em contraste, as células selvagens só apresentam bandas cromossômicas de alto peso molecular a partir de 48 horas de cultivo após a irradiação (Figura 12 – 6º painel, coluna esquerda). Esse resultado indica que as células superexpressando TcRad51 apresentam uma cinética de recuperação do DNA mais rápida do que as células selvagens.

#### **IV. Ensaios de recombinação**

Uma cinética de recuperação mais rápida de DNA fragmentado por radiação gama sugere maior eficiência de processos de recombinação nas células superexpressoras de Rad51. A integração de fragmentos de DNA exógenos no genoma também pode ocorrer através desse processo. Optou-se então pela verificação se as células superexpressando TcRad51 também possuem maior eficiência quanto à integração de fragmentos de DNA exógenos no genoma de *T. cruzi*. Com esse objetivo, os parasitos superexpressores foram transfectados com o plasmídeo pROCKGFPneo desenvolvido por DaRocha e colaboradores (2004b). Esse plasmídeo foi escolhido por possuir seqüência codificadora para GFP e para resistência a G418. Sua seqüência é idêntica aquela do vetor pROCKGFP<sub>higro</sub>, utilizado para construir o vetor de superexpressão de TcRad51, exceto pelo fato de possuir o gene codificador para resistência a G418 no lugar daquele que confere resistência a higromicina. Após a linearização desse plasmídeo, com a enzima *NotI*, esse foi transfectado em parasitos controle e superexpressando

TcRad51. Os parasitos transfectados com pROCKGFPneo foram plaqueados em placas de ágar sangue contendo G418 e em placas controle sem antibiótico. Após 20 dias de seleção, o número de clones obtidos nas duas placas foi quantificado e esses clones foram verificados quanto à expressão de GFP.

Aproximadamente, o mesmo número de clones foi obtido para as duas culturas nas placas sem antibiótico, demonstrando que a eficiência de plaqueamento foi similar para ambas as culturas (figura 13). Nessas placas, nenhum clone obtido das células controle apresentou a fluorescência verde. Enquanto para as células superexpressoras foi encontrado um clone expressando GFP de cinco observados. No entanto, nas placas contendo G418 foram obtidas cerca de três vezes mais clones na cultura superexpressando TcRad51 que na cultura controle. Além disso, todos os clones obtidos nas placas contendo antibiótico, para ambas as culturas, apresentavam expressão de GFP. Assim, esse ensaio, apesar de preliminar, sugere que a superexpressão de TcRad51 provavelmente aumenta a incorporação de plasmídeos no genoma desse parasita.

As células controle utilizadas nesse experimento foram previamente transfectadas com o plasmídeo pROCKGFPphygro, e que não estavam expressando a proteína GFP (cedido gentilmente por Carolina Furtado). Essas células foram utilizadas como controle devido à grande homologia presente entre os plasmídeo pROCKGFPphygro, utilizada para transfecção anterior tanto dessas células quanto das superexpressoras, com o plasmídeo pROCKGFPneo utilizado nesse ensaio. Isso poderia levar a falsa impressão

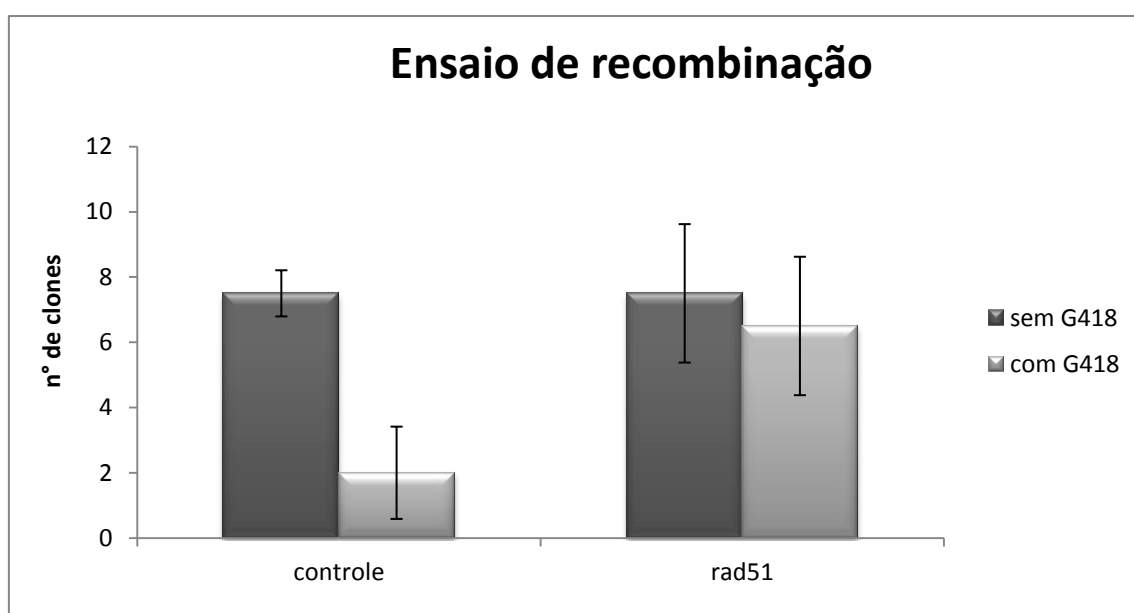


**Figura 13: Ensaio de recombinação através da integração de DNA exógeno no genoma de parasitos controle e superexpressando TcRad51.**

Essas células foram transfectadas com o plasmídeo pROCKGFPneo, e posteriormente plaqueadas em placas sem G418 (sem G418) e com antibiótico G418 (com G418). O número de clones obtidos foi determinado após vinte dias do plaqueamento. O experimento foi realizado em duplicata.

que o aumento da recombinação nas células superexpressoras era devido somente a uma maior homologia de seqüências e não devido a um aumento na recombinação nas células superexpressando TcRad51.

## **V. Análise de clones superexpressores de TcRad51.**

Os experimentos mostrados anteriormente, com os parasitos superexpressando TcRad51, foram realizados utilizando-se uma população de células transfectadas com o vetor para superexpressão de TcRad51, e posteriormente, submetidas à seleção por resistência a higromicina. No entanto, não foram selecionados clones a partir da população desses parasitos. Portanto, para obtenção de uma cultura homogênea contendo células com o mesmo nível de expressão de TcRad51, a população superexpressora de TcRad51 foi plaqueada em placas de ágar sangue contendo higromicina. Após 20 dias de cultivo, foram obtidos 18 clones. Posteriormente, esses clones foram transferidos para meio líquido, e após duas semanas de cultivo, foram obtidos 15 clones crescendo em meio líquido contendo higromicina.

### **V.1. Análise da expressão de TcRad51 nos clones obtidos a partir da cultura transfectada**

Foram realizadas extrações de RNA a partir de culturas de nove desses clones seguidos por *northern blot* para verificação da expressão de TcRad51 nesses parasitos. Dentre nove clones testados, três clones (9, 14 e 16) superexpressavam TcRad51 como mostra a figura 14. Os clones 16 e 9 apresentaram níveis de expressão de TcRad51 cerca de dez vezes maior que

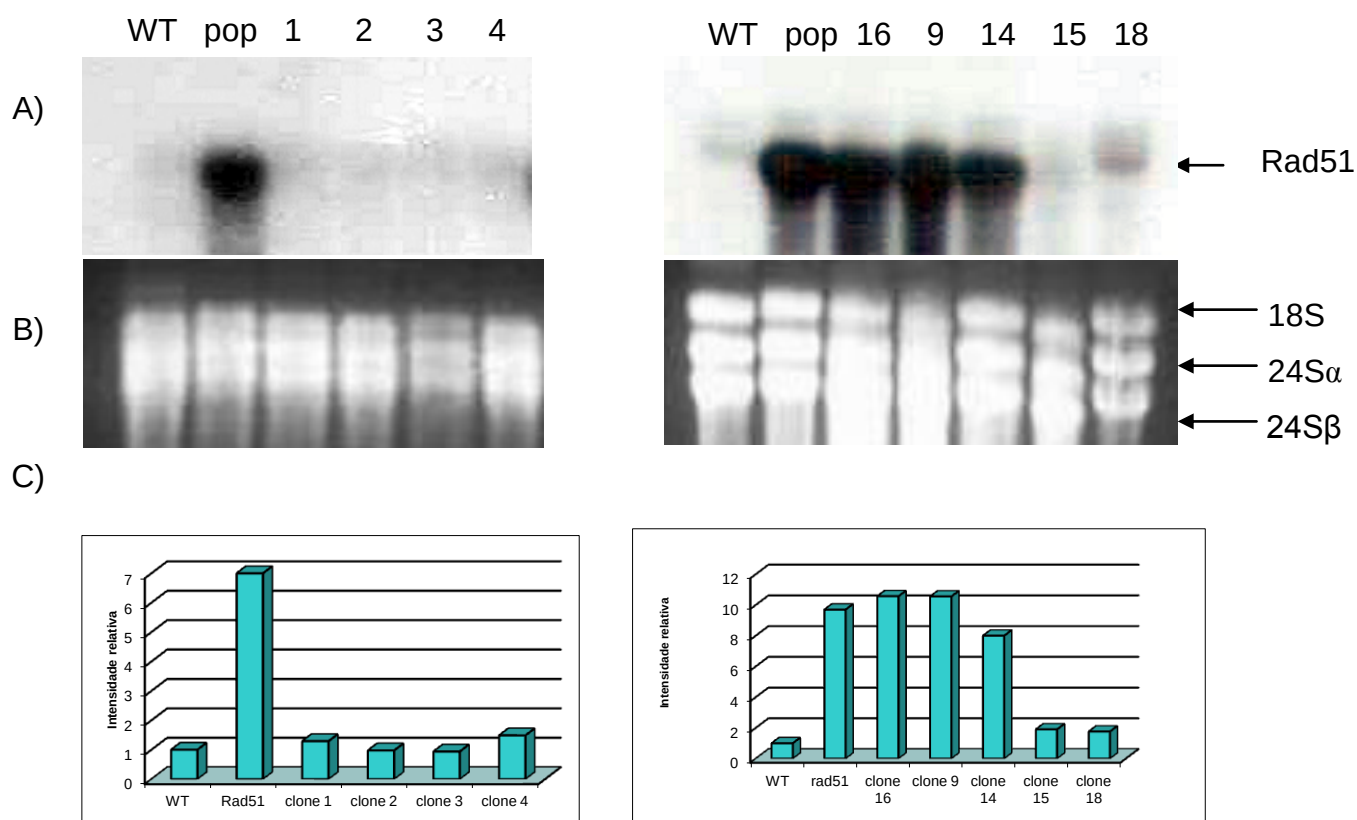


**Figura 14: Northern blot de clones superexpressando TcRad51.** A) Hibridação com sonda de TcRad51 do RNA total das culturas selvagem (WT), população transfectada com TcRad51 (pop), e os clones dessa população (1, 2, 3, 4, 16, 9, 14, 15 e 18). A seta mostra a posição do RNA de TcRad51. B) Gel de agarose corado com brometo de etídio contendo 15  $\mu$ g do RNA total extraído das culturas. As setas mostram as bandas ribossômicas. C) Gráfico de intensidade de bandas relativa à intensidade da banda de TcRad51 da cultura selvagem.

a cultura selvagem, enquanto o clone 14 apresentou aproximadamente cerca de oito vezes. Os clones 1, 2, 3, 4, 15 e 18 apresentaram níveis de expressão de TcRad51 similares ao da cultura selvagem (figura 14).

## **V.2. Análise do crescimento dos clones superexpressores de TcRad51.**

Foram analisadas curvas de crescimento para verificar a alteração no comportamento de crescimento desses clones superexpressores. Não foram observadas diferenças significativas de crescimento dos clones em comparação com a cultura selvagem ou com a população superexpressora (figura 15).

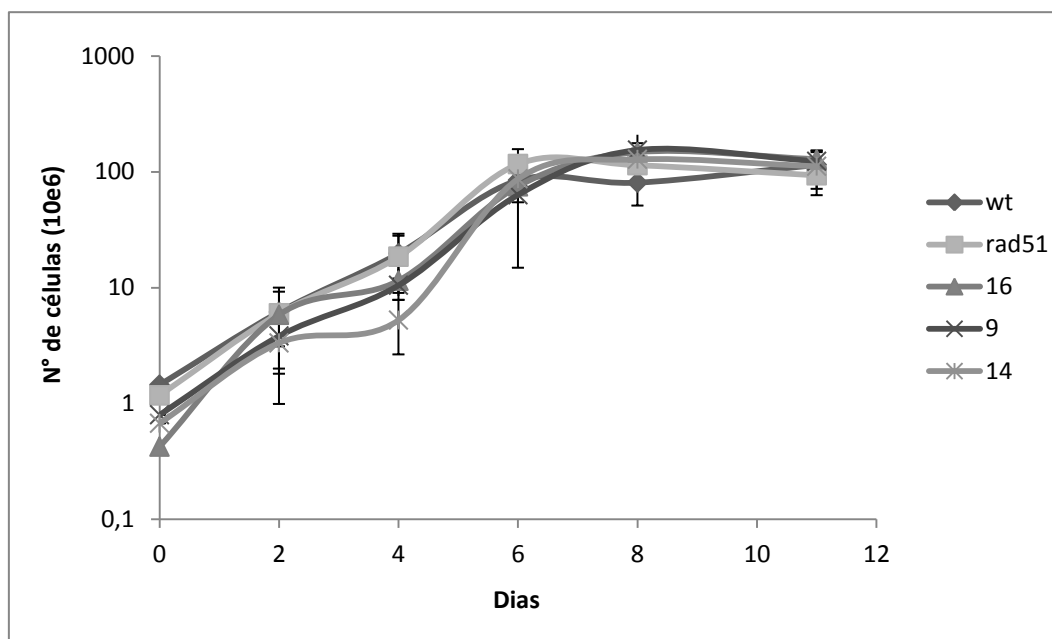


**Figura 15: Curva de crescimento de *T. cruzi* selvagem (WT), da população transfectada com TcRad51 (Rad51) e dos clones superexpressando TcRad51 (16, 9 e 14).** Esses parasitos foram cultivados em meio LIT partindo de uma concentração inicial de  $8 \times 10^5$  parasitos/ml. Os valores correspondem a média de triplicatas.

## Discussão

Os estudos em *Trypanosoma cruzi* têm se mostrado de grande importância devido a características peculiares de sua biologia e relevância para saúde pública, como agente etiológico da doença de Chagas, um mal muitas vezes crônico e debilitante. Todavia, pouco se sabe sobre o metabolismo de DNA nessa espécie.

Esse parasita possui grande variabilidade intraespecífica, exibindo tanto heterogeneidade genotípica quanto fenotípica. Acredita-se que essa variabilidade se deva à reprodução clonal que possibilita a divergência entre as linhagens, o que propicia o acúmulo de mutações independentes e leva ao surgimento de características próprias (Dykhuizen & Green, 1991). Recentemente, através da descrição de fusão celular entre esses organismos mediante seleção por drogas (Gaunt *et al*, 2003) e da demonstração de evidências da presença de híbridos na população natural de *T.cruzi* (Machado & Ayala, 2001), têm-se acreditado que a troca genética entre esses organismos, apesar de ser um evento raro, poderia explicar parte da variabilidade dessa espécie.

Uma outra indicação da importância da recombinação na biologia desse parasita é a presença de altos níveis de homozigose (Machado & Ayala, 2001) (Oliveira *et al*, 1998), uma característica não esperada para organismos assexuados (Welch & Meselson, 2000). Alguns estudos sugerem a possibilidade da recombinação mitótica e da conversão gênica, dois

mecanismos de recombinação, como responsáveis por essa homogeneização do genoma da maioria das cepas desse parasita (Machado & Ayala, 2001).

Outra característica interessante do *T. cruzi* é sua resistência a altas doses de radiação gama (Hanson, 1977; Takeda *et al*, 1986). Em outros organismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Dardalhon *et al*, 1994) e *Deinococcus radiodurans* (Grimsley *et al*, 1991) têm-se avaliado os efeitos da radiação gama no DNA. Através de análise da separação dos cromossomos por PFGE, esses estudos conseguiram demonstrar o reparo de DNA após exposição à radiação gama.

Regis-da-Silva e colaboradores (2006) também utilizaram a técnica de PFGE para demonstrar a recuperação do padrão normal de bandas cromossômicas no *T. cruzi* após a exposição a radiação gama. Foi observado que logo após a irradiação forma-se um rastro indicando que o DNA foi fragmentado. No entanto, após dois dias já são distinguidas bandas de tamanhos muito semelhantes aos cromossomos de *T. cruzi* não irradiado, demonstrando, assim, a capacidade de recuperação desse organismo após a irradiação.

Dessa forma, estudos do mecanismo de recombinação em *T. cruzi* são de grande interesse para avaliar sua contribuição para geração de variabilidade nesse parasita, além da resistência a agentes genotóxicos.

Um dos principais genes envolvidos na recombinação é o gene Rad51. Algumas estratégias podem ser consideradas para estudar esse gene em *T. cruzi*, tais como, superexpressão, nocaute, RNAi, entre outros. O RNAi não é

um mecanismo viável em *T. cruzi* devido a ausência de vários componentes desse processo nesse parasita (DaRocha *et al*, 2004a). Portanto, inicialmente escolhemos a superexpressão como primeira estratégia para analisar o gene TcRad51 em *T. cruzi*. Vários estudos têm demonstrado a importância da superexpressão de Rad51 na exploração das funções desse gene em outros organismos, tais como seu papel na integração de DNA exógenos no genoma (Yanez & Porter, 1999; Vispe *et al*, 1998), na instabilidade cromossômicas em células tumorais (Richardson *et al*, 2004; Flygare *et al*, 2001; Orre *et al*, 2006) e na resistência a agentes que causam quebras de fita dupla (Yanez & Porter, 1999; Vispe *et al*, 1998). Portanto, visando investigar o papel de TcRad51 na recombinação homóloga e no reparo de DNA, nós analisamos os efeitos da superexpressão dessa proteína em *T. cruzi*.

Com esse objetivo, desenvolvemos um plasmídeo para superexpressão de TcRad51 contendo gene capaz de conferir resistência a higromicina, o que possibilita a seleção de parasitos transfectados através da resistência a esse antibiótico. Além disso, esse plasmídeo contém região com homologia a  $\beta$ -tubulina flanqueando os genes de TcRad51 e de resistência a higromicina. Essa região propicia a integração desse fragmento no *locus* de  $\beta$ -tubulina do genoma deste organismo através de recombinação homóloga, possibilitando a geração de linhagens expressando estavelmente. A linearização do vetor facilita o processo de recombinação e possibilita a degradação de plasmídeos epissômicos. Após a seleção, os parasitos transfectados foram analisados quanto à expressão de TcRad51 através da técnica de *Northern Blot*. Os níveis da proteína TcRad51 desses parasitos também serão verificados

posteriormente, pois, não dispomos de anticorpos que reconheçam essa proteína para a realização de *western blot*. Foi observado que a cultura transfectada expressa cerca de dez vezes mais o mRNA de TcRad51 do que a cultura selvagem (Figura 8). Também foi verificado através de *Southern blot*, a integração de TcRad51 exógeno em um cromossomo de aproximadamente 1,9 Mb (Figura 7). Porcile e colaboradores (2003) realizaram um PFGE da cepa CL Brener e, através de *Southern blot* com sonda para  $\beta$ - tubulina, obtiveram quatro bandas cromossômicas com os seguintes tamanhos: 0.73, 0.95, 1.5 e 1.6 Mb. Portanto, comparando o perfil de bandas obtido no trabalho de Porcile e colaboradores (2003) e no nosso trabalho, é plausível sugerir que TcRad51 esteja integrado no *locus* de  $\beta$ -tubulina, uma vez que a banda de DNA cromossômico reconhecida pela sonda de TcRad51 possui aproximadamente o mesmo tamanho que uma das bandas desse *locus*. Para confirmar essa hipótese, pretendemos realizar um *Southern blot* dessa membrana com sonda para  $\beta$ - tubulina. Devemos esperar que o DNA cromossômico desse gene possui o mesmo tamanho que aquele que contém a sequência de TcRad51 exógena. Além disso, foi possível verificar no *Southern blot* com sonda para TcRad51 que a intensidade da banda endógena da cultura transfectada é aproximadamente duas vezes maior que a banda exógena. Esse resultado se deve a presença de dois alelos de TcRad51 no genoma do parasita (El Sayed *et al*, 2005), o que sugere que o TcRad51 exógeno esteja integrado em cópia única.

Todos os experimentos com tratamento genotóxico e o ensaio de recombinação foram realizados utilizando a população superexpressora de

TcRad51 selecionada através da resistência ao antibiótico higromicina. No entanto, com o objetivo de se obter, para futuros ensaios, uma cultura homogênea de células com o mesmo nível de expressão de TcRad51, clones da população superexpressora foram selecionados. Foi realizado *northern blot* dos clones selecionados e quatro clones superexpressando TcRad51 foram obtidos (figura 14). Isso demonstra que apesar da população ser cultivada na presença de antibiótico, a cultura possui células que não são superexpressoras. Isso pode ter ocorrido devido à integração somente do gene da resistência a higromicina ou devido à inibição da expressão de TcRad51 por algum motivo, como por exemplo, a deleção de regiões 5' e 3' UTR que auxiliam no processamento do mRNA.

Os clones superexpressores foram analisados quanto ao seu crescimento. Foi possível verificar que o crescimento apresentado por eles é similar ao da população superexpressora e das células selvagens (figura 15). Esse resultado indica que a superexpressão de TcRad51, mesmo quando homogênea, não afeta o crescimento do parasita em estudo. O mesmo não foi observado na superexpressão de TcRad51 em células humanas que apresentaram uma diminuição na taxa de crescimento e na eficiência de plaqueamento (Flygare *et al*, 2001). Em células de mamíferos foi descrito que a proteína Rad51 interage com diferentes proteínas que podem regular o ciclo celular como a proteína p53 (Buchhop *et al*, 1997). No entanto, essas proteínas não foram descritas em levedura e até o momento, também não foram identificadas em *T. cruzi*. Dessa forma, em células de mamíferos, Rad51 pode interferir no ciclo celular através de interação com proteínas reguladoras desse

processo, enquanto que em eucariotos mais primitivos essa interação não foi descrita. Além disso, os níveis de Rad51 se mantêm estáveis após o tratamento com agentes genotóxicos em células de mamíferos (Vispe *et al*, 1998) enquanto em outros eucariotos inferiores como o *T. cruzi* ocorre indução do mRNA de TcRad51 após ação desses agentes (Regis-da-Silva *et al*, 2006; Basile *et al*, 1992; McKean *et al*, 2001). Dessa forma, altos níveis de expressão de Rad51 devem ser prejudiciais para o crescimento normal das células de mamíferos, mas não interferem no crescimento de outros eucariotos inferiores.

Alguns trabalhos têm mostrado o envolvimento da recombinação no reparo de quebras de fita dupla (Keszenman *et al*, 1992; revisado em Symington, 2001) como também uma de suas principais proteínas, Rad51 (Richardson *et al*, 2004; Vispe *et al*, 1998; Yanez & Porter, 1999; Haaf *et al*, 1995). As células de *T. cruzi* superexpressando TcRad51 foram expostas a zeocina e à radiação gama que são agentes que causam quebras de fita dupla. Esses agentes atacam o DNA através de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), geradas pela ligação de oxigênio a zeocina (Povirk, 1996) ou pela hidrólise da água ocasionada pela exposição à radiação gama (Frankenberg *et al*, 1981). As ROS causam lesões no DNA como sítios AP (apurínicos/apirimídínicos), quebras de fita simples e dupla. Acredita-se que a quebra de fita dupla seja a causa primária da citotoxicidade induzida por esses dois agentes (Steighner & Povirk, 1990; Letavayová *et al*, 2006; Frankenberg *et al*, 1981). Dessa forma, foi verificado que as células superexpressando TcRad51 apresentam maior resistência a zeocina como também à radiação gama nas diferentes doses utilizadas. Esses resultados sugerem o

envolvimento de TcRad51 na resistência a agentes que causam quebra dupla no genoma do *T. cruzi*, possivelmente, através do reparo por recombinação dessas lesões. Corroborando com essa hipótese, verificamos recentemente a indução do mRNA de TcRad51 de 4 horas após a irradiação (Régis-Silva *et al*, 2006), indicando, assim, mais uma vez a importância do papel de TcRad51 no reparo de quebras duplas induzidas pela irradiação. Trabalhos utilizando a superexpressão de Rad51 em outros organismos também mostraram a importância de Rad51 na resistência a agentes que causam quebras de fita dupla. Nesses trabalhos, a superexpressão de Rad51 confere resistência a radiação gama em células de mamíferos (Vispe *et al*, 1998; Yanez & Porter, 1999).

A bactéria *Deinococcus radiodurans*, que é um organismo extremamente resistente à radiação ionizante, possui um perfil de crescimento após a irradiação bastante característico. Nesta bactéria são bem caracterizadas três fases após exposição à radiação gama: uma fase inicial que dura as três primeiras horas após a exposição a 15000 Gy, onde o crescimento está totalmente inibido. Nessa fase ocorre indução de proteínas de reparo por recombinação (RecA), mas ainda não é observado o reparo. Uma segunda fase, no intervalo entre 3 a 9 horas, onde se observa um progressivo aumento das taxas de reparo e uma última fase que vai de 9 a 24 horas, onde a expressão de RecA é inibida e o crescimento celular volta a ocorrer (Liu *et al*, 2003). Esse comportamento é também verificado em *Saccharomyces cerevisiae*, porém com doses de radiação de 200 Gy e 800 Gy (Mercier *et al*, 2001). Observando-se o perfil de crescimento apresentado pelo *T. cruzi* tanto

da cultura selvagem quanto da superexpressora de TcRad51 após a radiação gama, é possível perceber que logo após a irradiação também não ocorre crescimento desses parasitos. Nessa fase pode ocorrer uma redução do número de parasitos, proporcionalmente a dose utilizada, como também uma parada no crescimento desses parasitos por um período de tempo que varia de acordo com a dose administrada e a cultura que está sendo analisada. Posteriormente esses parasitos conseguem retomar o crescimento. Portanto, é possível que o parasita *T. cruzi* também possua as três fases definidas para *D. radiodurans*, mas possuindo maiores períodos de duração das fases devido a sua replicação mais lenta em relação à bactéria. Além disso, foi observado que nas três doses (200 Gy, 500 Gy e 1000 Gy) de radiação gama, os parasitos superexpressando TcRad51 iniciam seu crescimento antes que os parasitos selvagens (Figuras 10 e 11). Isso pode sugerir que a fase de parada na replicação dessas células foi menor que aquela observada para parasitos selvagens. Como esse período corresponde a fase em *D. radiodurans* que ocorre o reparo de DNA, é provável que as células superexpressoras possuam um reparo mais eficiente, possibilitando uma recuperação mais rápida desses parasitos.

Com o objetivo de verificar se uma maior eficiência na cinética de recuperação dos parasitos transfectados com TcRad51 após a irradiação, corresponde a uma maior rapidez no reparo das quebras de fita dupla, foi realizado um PFGE (figura 12). Foi verificado que após a irradiação ocorre uma grande fragmentação do DNA em ambas culturas, visualizado pelo rastro no gel. No entanto, podemos observar que as células superexpressoras voltam a

apresentar bandas de alto peso molecular em um período menor de cultivo após a irradiação quando comparadas com as células selvagens. Esse resultado indica que o início da recuperação do DNA nas células superexpressando TcRad51 ocorre anteriormente às células selvagens, dado que fragmentação do DNA é reparada mais rapidamente nessas células. É possível inferir, uma vez que não houve um grande declínio no número de células após a irradiação na dose de 500 Gy, que o *T. cruzi* consegue reparar o DNA após a fragmentação desse, e posteriormente, retoma seu crescimento. Esse resultado indica o papel de TcRad51 na recuperação de quebras de fita dupla. Além do mecanismo de recombinação homóloga que pode ser iniciado por Rad51, uma segunda via que poderia recuperar as quebras de fita dupla é o mecanismo NHEJ que não utiliza homologia de seqüências para a recuperação desses danos. No entanto, dados do projeto genoma de *T. cruzi* (El Sayed *et al*, 2005) demonstraram que alguns genes importantes dessa via não estão presentes em *T. cruzi*, sugerindo que provavelmente, como em *Plasmodium falciparum* (Gardner *et al*, 2002), esse processo não ocorre no parasita.

A recombinação homóloga é também o mecanismo através do qual ocorre a substituição estável de uma seqüência cromossômica por uma exógena. Quando uma célula é transfectada, o plasmídeo é clivado por nucleases que produzem extremidades livres, imitando uma quebra de fita dupla (Smith, 2001). Essas extremidades podem ser reconhecidas pelo complexo Rad51/Rad52, iniciando o processo de recombinação homóloga. Em células humanas, a integração de plasmídeos no genoma é um processo de

baixa eficiência quando comparada com outros organismos como a levedura, o que pode ser exemplificado pela geração de nocautes nesses dois organismos (Yanez & Porter, 1999). Isso se deve provavelmente ao fato que em humanos o processo de NHEJ é o principal mecanismo utilizado para reparo de quebra dupla e ela pode ocorrer durante todo o ciclo celular enquanto a recombinação homóloga ocorre principalmente nas fases S e G2. No entanto, em leveduras e em outros eucariotos mais primitivos, a recombinação homóloga é o principal processo de reparo de quebra de fita dupla e pode ocorrer durante todo ciclo celular (revisado em Sonoda *et al*, 2001).

Em tripanosomatídeos, a recombinação homóloga é a principal via para integração de plasmídeos em seus genomas (Conway *et al*, 2002; Chung & Swindle, 1997; Eid & Sollner-Webb, 1991). Dessa forma, verificamos se TcRad51 está envolvido na integração de DNA exógenos em *T. cruzi*. Com essa finalidade, foram utilizadas as células superexpressando TcRad51 para a realização de um ensaio visando verificar a eficiência de integração de fragmentos transfectados através da contagem do número de clones obtidos. Como mostrado na figura 13, foi observado um número maior de clones resistentes ao antibiótico em culturas transfectadas de células superexpressando TcRad51 do que de células controle. Além disso, foi obtido um clone expressando GFP de cinco analisados nas placas sem antibiótico das células superexpressoras, indicando que há um número maior de recombinantes nessas células superexpressoras. Esses resultados, apesar de preliminares, sugerem que a superexpressão de TcRad51 pode aumentar a eficiência de integração de plasmídeos no genoma. Em células humanas, a

superexpressão de Rad51 também possibilitou o aumento da eficiência de integração de plasmídeos (Yanez & Porter, 1999; Vispe *et al*, 1998). Nesses trabalhos, os níveis de expressão de Rad51 nas células superexpressoras eram de quatro vezes quando comparados com os níveis da células controle. Consegui-se obter um aumento na integração de DNA exógeno no genoma das células superexpressoras em relação a células controle de 2 a 3 vezes, quando analisado em dois genes alvos no trabalho de Yanez & Porter (1999) e de aproximadamente 20 vezes quando analisado um gene alvo no trabalho de Vispe e colaboradores (1998). Essa diferença no nível de incorporação se deve ao fato que diferentes células e diferentes plasmídeos foram utilizados nesses trabalhos.

A recombinação homóloga provavelmente possibilitou a integração de plasmídeos no genoma da cultura selvagem e principalmente, da cultura superexpressora. Vários trabalhos têm relatado a preponderância do envolvimento da recombinação homóloga em eventos de integração de fragmentos nos cromossomos em tripanosomatídeos (Chung & Swindle, 1997; Lee & Van der Ploeg, 1990). Inclusive, mesmo plasmídeos pouco recombinogênicos se integram no genoma de *T. cruzi* e as cópias que não se integram são rapidamente degradadas (Lorenzi *et al*, 2003). Em *T. brucei* foi verificado que para a integração de DNA exógeno dentro do genoma desse parasita é necessário um alto grau de homologia entre a sequência do fragmento doador com o fragmento alvo (Blundel *et al*, 1996). Dessa forma, como o plasmídeo utilizado tem uma região de aproximadamente 1000 pb com homologia a  $\beta$ -tubulina e essa região possui cópias no genoma do parasita, é

bastante provável que aqueles clones resistentes ao antibiótico e expressando GFP possuam plasmídeos integrados através de recombinação homóloga. Além disso, no trabalho de Yanez & Porter (1999), foi verificado que a superexpressão de Rad51 aumenta os níveis de integração de DNA realizados através da recombinação homóloga, enquanto aquelas integrações realizadas por NHEJ mantém os mesmos níveis quando comparada com células controle.

Conway e colaboradores (2002) analisaram a recombinação em *Trypanosoma brucei* através da integração de DNA transfectados. Esses autores utilizaram construções lineares de DNA com homologia para regiões únicas ou regiões presentes em várias cópias. Esses fragmentos foram transfectados em parasitos nocautes para Rad51, e foram avaliadas quanto à integração desses fragmentos. Duas vias principais foram identificadas sendo que a mais comum e preponderante é a via de recombinação homóloga dependente de Rad51. A segunda via é de recombinação homóloga independente de Rad51. Essa via é menos utilizada para integração de fragmentos, cerca de dez a trinta vezes menos eficiente na transfecção, possuindo um papel bastante reduzido na integração de fragmentos. Essa via possibilita recombinar substratos com homologia de seqüências muito curtas, permitindo, em alguns casos, recombinações aberrantes através de microhomologias. No entanto, foi visto que essas duas vias também agem na troca de VSG durante a variação antigênica, apesar da primeira via ser a maior responsável pela integração de fragmentos no genoma (Conway *et al*, 2002). Como em nosso trabalho estamos superexpressando Rad51, provavelmente, a via de recombinação homóloga dependente de Rad51 será facilitada pelo

excesso de proteínas de Rad51 o que propicia uma maior facilidade na integração de vetores no genoma desses parasitos no *locus* esperado, o que gera um maior número de clones resistentes. Temos como perspectiva, realizar uma amplificação dos clones obtidos utilizando iniciadores dentro do plasmídeo e fora desse, ou seja, na região na qual ele estaria integrado se tivesse ocorrido recombinação, para confirmar a integração do plasmídeo no *locus* esperado. Além disso, seria interessante realizar esse ensaio para analisar se há diferenças entre as células selvagens e superexpressando Rad51 quando transfectadas com vetores com homologia para *locus* único, que possui uma baixa eficiência de integração como relatado por Teixeira e colaboradores (1999).

## Perspectivas

Temos como perspectivas repetir o ensaio de recombinação para confirmar os resultados obtidos e verificar o local de integração dos fragmentos transfectados. Além disso, transfectaremos o parasita com plasmídeos contendo fragmentos direcionados para integração em um gene de *locus* único para analisar se as células superexpressoras de Rad51 aumentam essa integração em comparação com as células controle.

Pretendemos, ainda, estudar os fenótipos dos clones superexpressando TcRad51, para verificar se culturas homogêneas superexpressando TcRad51 também apresentam resistência à radiação gama. Além disso, pretendemos analisar o comportamento dessas células quando expostas a outros agentes genotóxicos como, por exemplo, a luz UV.

A capacidade desses organismos de causarem infecção será avaliada em camundongos, para analisar se a superexpressão de TcRad51 aumenta a infectividade.

A obtenção de anticorpos anti-TcRad51 irá permitir determinar os níveis dessa proteína nas células superexpressando TcRad51 através de *western blot*.

Além desses estudos, propomos a realização de nocaute de TcRad51 para verificar a sua importância na biologia desse parasita.

## Bibliografia

- Aihara H, Ito Y, Kurumizaka H, Yokoyama S, Shibata T. (1999) The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J. Mol. Biol.* **290**(2): 495-504
- Augusto-Pinto L, Bartholomeu DC, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR. (2001) Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* **272**(1-2): 323-333
- Augusto-Pinto L, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR. (2003) Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics.* **164**(1): 117-26.
- Basile G, Aker M, Mortimer RK. (1992) Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene Rad51. *Mol. Cell. Biol.* **12**(7): 3235-3246
- Baumann P & West SC. (1998) Role of the human Rad51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *TIBS.* **23**: 247-251
- Baumann P, Benson FE, West SC. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell.* **87**(4): 757-766.

- Blundell PA, Rudenko G, Borst P. (1996) Targeting of exogenous DNA into *Trypanosoma brucei* requires a high degree of homology between donor and target DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**: 215-229
- Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. (2000) Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* **30**: 35-44
- Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturz-becher HW, Harris CC. (1997) Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3868-3874
- Buscaglia CA & Di Noia JM. (2003) *Trypanosoma cruzi*: clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infecton.* **5**: 419-427
- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzalez A, Degrave W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, *et al.* (1995) Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol. Biochem. Parasitol.* **71**(2): 273-8.
- Chung SH & Swindle J. (1997) *Trypanosoma cruzi*: circularization of linear DNA fragments prior to integration during generation of stable transformants. *Mol. Biochem. Parasitol.* **89**: 321–325
- Church GM & Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 1991-1995

- Conway C, Proudfoot C, Burton P, Barry JD, McCulloch R. (2002) Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **45**(6): 1687-1700
- Dardalhon M, Nohturfft A, Meniel V, Aeverbeck D. (1994) Repair of DNA double-strand breaks induced in *Saccharomyces cerevisiae* using different  $\gamma$ -ray dose-rates: A pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**(3): 307-314
- DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. (2004a) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **133**(2):175-86.
- DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM. (2004b) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* **92**(2): 113-120.
- Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. (2002) A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.* **195**(4): 401-413.
- Dykhuizen DE & Green L. (1991) Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J. Bacteriol.* **173**(22): 7257-7268

- Eid J & Sollner-Webb B. (1991) Stable integrative transformation of *Trypanosoma brucei* that occurs exclusively by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**(6):2118-2121.
- El Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwa G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, *et al.* (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. **309**: 409-415
- Engman DM, Reddy LV, Donelson JE, Kirchhoff LV. (1987) *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22** (2-3): 115-123.
- Farez-Vidal ME, Gallego C, Ruiz-Perez LM, Gonzáles-Pacanowska D. (2001) Characterization of uracil-DNA-glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **29**(7): 1549-1555
- Flygare J, Fält S, Ottervald J, Castro J, Dackland AL, Hellgren D, Wennborg A. (2001) Effects of HsRad51 overexpression on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **268**: 61-69
- Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Blöcher D, Harbich R. (1981) Evidence for DNA double-strand break as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. *Rad. Res.* **88**: 524-532

- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*. **2** (3): 226-235
- Freitas JM. (2003) Mapeamento cromossômico de marcadores moleculares e de genes envolvidos no reparo de DNA em *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **419**(6906): 498-511.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA. (2003) Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. **421**(6926): 936-939.
- Geoghegan DS, Skinner-Adams T, Davis TM. (2001) *Plasmodium falciparum*: isolate-specific radiosensitivity. *Exp. Parasitol.* **99**(2): 108-10.
- Granéli A, Yeykal CC, Robertson RB, Greene EC. (2006) Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(5): 1221-1226.

- Grimsley JK, Masters CI, Clark EP, Minton KW. (1991) Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of DNA double-strand breakage and repair in *Deinococcus radiodurans* and a radiosensitive mutant. *Int. J. Radiat. Biol.* **60**(4): 613-26.
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC. (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(6): 2298-2302
- Hanson WL. (1977) Experiments on immunoprophylaxis against Chagas' disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **93**: 281-283
- Jiang CZ, Yen CN, Cronin K, Mitchell D, Britt AB. (1997) UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* **147**(3): 1401-9.
- Keszenman DJ, Salvo VA, Nunes E. (1992) Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J. Bacteriol.* **174**: 3125-3132
- Kurumizaka H, Aihara H, Ikawa S, Kashima T, Bazemore LR, Kawasaki K, Sarai A, Radding CM, Shibata T. (1996) A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein. A gateway model for double-stranded DNA binding. *J Biol. Chem.* **271**(52): 33515-33524.

- Lee MG & Van der Ploeg LH. (1990) Homologous recombination and stable transfection in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. *Science*. **250**(4987): 1583-1587.
- Letavayová L, Marková E, Hermanská K, Vlcková V, Vlasáková D, Chovanec M, Brozmanová J. (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **5**: 602-610
- Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, Stair J, Wu L, Thompson DK, Xu D, Rogozin I, Gaidamakova EK, Zhai M, Makarova KS, Koonin EV, Daly MJ. (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 4191-4196
- Lorenzi HA, Vazquez MP, Levin MJ (2003) Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. **310**: 91-99
- Machado CA & Ayala FJ. (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**(13): 7396-7401
- Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SMR. (2006) DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat. Res.* **612**(1): 40-57

- McCulloch R & Barry JD. (1999) A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev.* **13**(21): 2875-2888.
- McKean PG, Keen JK, Smith DF, Benson FE (2001) Identification and characterization of a Rad51 gene from *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**: 209-216
- Mercier G, Denis Y, Marchb P, Picard L, Dutreix M. (2001) Transcriptional induction of repair genes during slowing of replication in irradiated *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **487**: 157–172
- Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. (1977) The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**(3): 217-25.
- Ogawa T, Yu X, Shinohara A & Egelman EH. (1993) Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science.* **259**: 1896-1899
- Olivares M, López MC, García-Pérez JL, Briones P, Pulgar M, Thomas MC. (2003) The endonuclease NL1Tc encoded by the LINE L1Tc from *Trypanosoma cruzi* protects parasites from daunorubicin DNA damage *Biochem. Biophys. Acta.* **1626**: 25– 32
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CH, Smith CL, Pena SDJ. (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3776-3780

- Orre LM, Fält S, Szeles A, Lewensohn R, Wennborg A, Flygare J. (2006) Rad-51 related changes in global gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 334-342
- Perez J, Gallego C, Bernier-Villamor V, Camacho A, Gonzalez-Pacanowska D & Ruiz-Perez LM. (1999) Apurinic/apyrimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **27**(3): 771-7
- Porcile PE, Santos MRM, Souza RT, Verbisck NV, Brandão A, Urmenyid A, Silva R, Rondinelli E, Lorenzi H, Levin MJ, Degrave W, Silveira JF. (2003) A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene.* **308**: 53–65
- Povirk LF. (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res.* **355**: 71-89
- Proudfoot C & McCulloch R. (2005) Distinct roles for two Rad51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res.* **33**(21): 6906-6919
- Regis-da-Silva CG, Freitas JM, Passos-Silva DG, Furtado C, Augusto-Pinto L, Pereira MT, Darocha WD, Franco GR, Macedo AM, Hoffmann JS, Cazaux C, Pena SD, Teixeira SM, Machado CR. (2006) Characterization of the

*Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* [Epub ahead of print]

Richardson C, Stark JM, Ommundsen M, Jasin M. (2004) Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene*. **23**(2): 546-553.

Robello C, Gamarro F, Castanys S, Alvarez-Valin F. (2000) Evolutionary relationship in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene*. **246**: 331-338.

Roca AI, Cox MM. (1997) RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic. Acid. Res Mol. Biol.* **56**: 129-223. Review.

Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald, D, Hendzel, M, West SC, Jasin M, Masson JY. (2006) Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break *in vivo*. *Embo Journal*. **25**: 222-231

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, v.1-3

Schön I & Martens K. (2003) No slave to sex. *Proc R. Soc. Lond. B*. **270**: 827-833

Shibata T, Nishinaka T, Mikawa T, Aihara H, Kurumizaka H, Yokoyama S, Ito Y. (2001) Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic

property of a DNA structure induced by RecA/Rad51-family proteins: A possible advantage of DNA over RNA as genomic material. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98** (15): 8425-8432

Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*. 69(3):457-70

Silva CGR. (2002) Clonagem e caracterização funcional do gene Rad51 de *T. cruzi*. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.

Smith K. (2001) Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reprod. Nutr. Dev.* **41**: 465–485.

Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* **17**(2): 598-608.

Sonoda E, Takata M, Yamashita YM, Morrison C, Takeda S. (2001) Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 8388-8394

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-152

- Souto RP, Zingales B. (1993) Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**(1): 45-52.
- Steighner RJ, Povirk LF. (1990) Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: Implications for the mechanism of double-strand cleavage (apurinic/apyrimidinic sites/oxidative mutagens/closely opposed lesions/endonuclease III) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 8350-8354
- Sung P, Krejci L, Komen SV e Sehorn MG. (2003) Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *J. Biol. Chem.* **278**(44): 42729–42732
- Sung P, Stratton SA. (1996) Yeast Rad51 recombinase mediates polar DNA strand exchange in the absence of ATP hydrolysis. *J Biol. Chem.* **271**(45): 27983-27986
- Symington LS. (2002) Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(4): 630–670
- Takeda GK, Campos R, Kieffer J. (1986) Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **28**(1): 15-18.
- Teixeira SMR & DaRocha WD. (2003) Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genetics Mol. Res.* **2**(1): 148-158

- Teixeira SMR, Otsu K, Hill KL, Kirchho. LV, Donelson JE. (1999) Expression of a marker for intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in extracellular spheromastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **98**:265–270
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **83**(1): 115-119.
- Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* **26**(12): 2859-2864.
- Welch DM & Meselson M (2000) Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science.* **288**: 1211-1215
- WHO, 2006: [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/)
- Xia SJ, Shammass MA, Shmookler Reis RJ. (1997) Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. *Mol. Cell Biol.* **17**(12): 7151-7158.
- Yanez RJ & Porter AC. (1999) Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51. *Gene Ther.* **6**(7): 1282-1290.
- Yonetani Y, Hochegger H, Sonoda E, Shinya S, Yoshikawa H, Takeda S, Yamazoe M. (2005) Differential and collaborative actions of Rad51 paralog

proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **33**(14): 4544-4552.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MRS. (1999) Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**(1): 159-164.