



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DANIELLE GOMES PASSOS SILVA. Aos nove dias do mês de novembro de 2010, às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudos do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo de DNA", requisito final para a obtenção do grau de *Doutor em Ciências: Biologia Molecular*. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Renato Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, da Universidade de São Paulo, aprovada; Dr. José Franco da Silveira Filho, da Universidade Federal de São Paulo, aprovada; Dra. Fabíola Mara Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Aristóbolo Mendes da Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Carlos Renato Machado, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 9 de novembro de 2010.

Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo - USP / Ribeirão Preto

Dr. José Franco da Silveira Filho - UNIFESP

Dra. Fabíola Mara Ribeiro - UFMG

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva - UFMG

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - co-orientadora - UFMG

Dr. Carlos Renato Machado - orientador - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

# Estudos do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo de DNA.

Danielle Gomes Passos Silva

Orientador: Carlos Renato Machado  
Co-orientadora: Santuza M. R. Teixeira

Tese 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  
obtenção do grau de Doutor em  
Bioquímica.

Belo Horizonte  
Novembro/2010

# Agradecimentos

Agradeço inicialmente ao Nem por todos esses anos de convivência harmoniosa, pelos muitos incentivos que recebi em momentos cruciais, pela disponibilidade e entusiasmo frente aos resultados. Muito obrigada por ter me orientado durante todos esses anos de forma tão tranquila e compreensiva.

À Santuza, pelo exemplo de dedicação, competência, rigor científico, pela disponibilidade para discutir os resultados, pelos conselhos e ajuda na solução de problemas que foram muito importantes para a minha formação e para realização dessa tese.

Ao Richard, por ter me recebido em Glasgow de forma tão acolhedora. Muito obrigada pelas discussões dos resultados, pelo entusiasmo em buscar respostas, pelo carinho, pela confiança e por ter tido muita sensibilidade em momentos difíceis.

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

Ao Jorge, muito obrigado pela disponibilidade e atenção durante meus primeiros anos no laboratório e de ter me transmitido tanto conhecimento de forma aprofundada e que foram essenciais para minha formação.

Ao grupo de reparo, que tornaram a convivência e o dia a dia mais agradável e divertido. Muito obrigado pelas ajudas na bancada e nas discussões de experimentos. Queria agradecer especialmente a Carolzinha, primeiramente pela amizade durante todos esses anos, pela ajuda em muitos sentidos, seja na cumplicidade na escrita de artigos, por ter me ensinado e ter discutido muitos dos resultados aqui apresentados, seja por sua alegria, confiança e carinho. Ao João Pedro por estar sempre disponível para ajudar e ter me salvado várias vezes nos momentos de desespero, ao Mateus pelas brincadeiras, discussões e conversas, à Thais e a Selma por terem me dado a oportunidade de ensinar um pouco do que eu aprendi, ao Pedro, à Paula, à Mariana, à Jojo, pela convivência agradável. Agradeço aos ex-alunos: Alice, Michele, Carlos Gustavo, Débora Aline e Bruno que também contribuíram para realização desse trabalho.

À Marcela, por sempre ser essa grande amiga, dentro e fora do laboratório, de longe ou perto. Muito obrigado por sempre ter me apoiado durante todos esses anos.

Aos todos os alunos e ex-alunos do LGB, pelas discussões de experimentos, ajudas na bancada, pelas conversas, brincadeiras e

convivência agradável. Em especial queria agradecer ao Lucas por ter me ajudado na escolha da capa, a Ferdi por escutar as lamúrias de quem está terminando uma tese, ao Rodrigo por ter dado prioridade aos sequenciamentos desse trabalho e ao Léo pelo carinho e apoio durante a escrita desta tese.

A Neuza, Kátia e Rúbia obrigado por facilitar o nosso trabalho, contribuindo para a manutenção do funcionamento do laboratório.

Aos membros do *Welcome Centre for Molecular Parasitology* que me receberam tão bem e tornaram a minha experiência em Glasgow muito rica e agradável. Gostaria de agradecer especialmente ao Lucio por ter me ajudado em todos os sentidos durante a minha estadia na Escócia. Muito obrigado pelo apoio, pelas conversas, jantares, por ter me recebido em sua casa e ter me apresentado Glasgow. À Rachel e a Anna que me ensinaram as técnicas do laboratório, pela amizade e o carinho. Ao Calvin e aos demais membros do grupo dos professores Richard e Barry pelos ensinamentos, discussões de resultados e conversas.

Ao professor Sérgio Schenkman por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização dos experimentos de imunolocalização. Gostaria de agradecer a todos os membros do seu laboratório e em especial a Sheila pela disponibilidade em todos os momentos em que precisei, pela amizade, pelos ensinamentos e por ter me recebido tão bem.

À Fernanda Caldas e ao Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas pela realização dos experimentos para obtenção de anticorpos.

A todos do Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas, principalmente, a Priscila, Patrícia e Rosiane, que me auxiliaram em tantos experimentos.

Aos demais laboratórios do departamento de Bioquímica e Imunologia pela ajuda no auxílio de experimentos e reagentes.

Aos meus amigos pelos tantos momentos de alegria e que tornaram esses anos mais leves e divertidos.

À minha família por estar sempre ao meu lado, torcendo por mim. Gostaria de agradecer ao Pá por acreditar em mim, sempre apoiar as minhas escolhas, pelo carinho e amor. Em especial, queria agradecer ao meu pai pelo amor, carinho e dedicação de forma tão plena mesmo que por tão pouco tempo. A minha mãe pelo exemplo, amor incondicional, pelo colo e companheirismo e por ter me apoiado sempre mesmo que isso significasse ficar longe. Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e contribuíram diretamente para o meu crescimento pessoal e profissional, pela amizade e conselhos. Sou muito grata a vocês.

# Índice

<u>ÍNDICE .....</u>	<u>I</u>
<u>LISTA DE FIGURAS .....</u>	<u>V</u>
<u>ABREVIATURAS.....</u>	<u>IX</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>XII</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>XIV</u>
<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
1. O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	1
1.1. DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	4
1.2. MECANISMOS DE GERAÇÃO DE VARIABILIDADE.....	8
2. REPARO DE DNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS .....	12
2.1. MECANISMOS DE RECOMBINAÇÃO NO GENOMA.....	20
2.2. RAD51 E A RECOMBINAÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS .....	26
<u>OBJETIVOS .....</u>	<u>31</u>
<u>MATERIAL E MÉTODOS .....</u>	<u>32</u>
1. INICIADORES .....	32
2. MANIPULAÇÃO DE DNA.....	33
2.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO E PRECIPITAÇÃO POR ETANOL .....	33
2.2. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR .....	34
2.2.1. PCR DE COLÔNIA DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS.....	35
2.2.2. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL .....	35
2.3. PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE.....	37

2.4. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	37
2.5. VETORES PLASMIDIANOS E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA .....	37
2.5.1. LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	39
2.5.2. TRANSFORMAÇÃO .....	40
2.5.3. EXTRAÇÃO PLASMIDIAL.....	42
2.6. SEQUENCIAMENTO DE DNA .....	42
3. ELETROFORESE EM CAMPO PULSÁTIL - PFGE.....	43
3.1. TRANSFERÊNCIA DE <i>SOUTHERN BLOT</i> .....	44
4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>T. CRUZI</i> E <i>NORTHERN BLOT</i> .....	45
4.1. HIBRIDAÇÃO E MARCAÇÃO DA SONDA. ....	46
5. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	47
5.1. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i> BL21 .....	47
5.1.1. EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA .....	47
5.1.2. TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA .....	48
5.1.3. EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TcRAD51 DE <i>T. CRUZI</i> ....	49
5.2. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	50
5.3. <i>WESTERN BLOT</i> .....	50
5.4. IMUNOLOCALIZAÇÃO DE TcRAD51.....	51
6. CULTURA E TRANSFEÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> .....	52
6.1. SELEÇÃO E ANÁLISE DE CLONES TRANSFECTADOS.....	54
7. CULTURA E TRANSFEÇÃO DE <i>T. BRUCEI</i> .....	54
7.1. TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS SANGUÍNEAS DE <i>T. BRUCEI</i> E SELEÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS .....	55
8. SENSIBILIDADE AO DANO EM DNA.....	56
8.1. ENSAIOS EM <i>T. CRUZI</i> .....	56
8.2. ENSAIOS EM <i>T. BRUCEI</i> .....	59
8.2.1. CURVA DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA A AGENTES GENOTÓXICOS .....	59

8.2.2. ANÁLISE DE VALORES DE IC50 POR ALAMAR BLUE PARA MMS E FLEOMICINA.....	60
9. ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO ATRAVÉS DE TRANSFECCÃO .....	61

## RESULTADOS..... 63

1. GERAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>T. CRUZI</i> SUPEREXPRESSANDO TCRAD51 .....	63
1.1. ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DE TCRAD51 EXÓGENO NO GENOMA DOS PARASITOS TRANSFECTADOS.....	64
1.2. ANÁLISE DO MRNA DOS PARASITOS TRANSFECTADOS .....	66
1.3. AVALIAÇÃO DO PAPEL DE TCRAD51 NO REPARO DE QUEBRAS DUPLAS DE DNA .....	66
1.4. ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO DO DNA APÓS A IRRADIAÇÃO. ....	71
2. GERAÇÃO DE LINHAGENS <i>T. CRUZI</i> HEMINOCAUTES DE TCRAD51 .....	73
2.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RAD51 DOS PARASITOS TRANSFECTADOS .....	75
2.1.1. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TCRAD51.....	78
2.1.2. <i>WESTERN BLOT</i> DOS PARASITOS TRANSFECTADOS .....	81
2.2. PARASITOS HEMINOCAUTES DE TCRAD51 APRESENTAM MAIOR SENSIBILIDADE À RADIAÇÃO GAMA .....	81
3. LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA TCRAD51 ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO GAMA.....	84
4. ANÁLISE DO PAPEL DE TCRAD51 NO REPARO DE LESÕES GERADAS POR DIFERENTES AGENTES GENOTÓXICOS. ....	89
4.1. ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE RAD51 NÃO AFETA SENSIBILIDADE DE <i>T. CRUZI</i> A AGENTES CAUSADORES DE <i>CROSSLINKS</i> NO DNA.....	89
4.2. ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE RAD51 AFETA SENSIBILIDADE DE <i>T. CRUZI</i> AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	90
4.3. ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE RAD51 AFETA SENSIBILIDADE DE <i>T. CRUZI</i> AO BENZONIDAZOL ... .....	93

5. PAPEL DE RAD51 DE <i>T. BRUCEI</i> NO REPARO DE <i>CROSSLINKS</i> E LESÕES OXIDATIVAS NO DNA NESSE ORGANISMO .....	95
5.1. GERAÇÃO DE LINHAGENS NOCAUTES PARA RAD51 EM <i>T. BRUCEI</i> .....	95
5.2. NOCAUTE DE TBRAD51 NÃO AFETA SENSIBILIDADE DE <i>T. BRUCEI</i> À CISPLATINA .....	97
5.3. NOCAUTE DE TBRAD51 AUMENTA SENSIBILIDADE DE <i>T. BRUCEI</i> AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	99
6. COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcRAD51 E TBRAD51 EM <i>T. BRUCEI</i> .....	99
6.1. GERAÇÃO E ANÁLISE DE LINHAGENS <i>T. BRUCEI</i> NOCAUTES PARA TBRAD51 E TRANSFECTADOS COM TcRAD51 OU TBRAD51 .....	101
6.2. TcRAD51 É CAPAZ DE COMPLEMENTAR PARASITOS <i>T. BRUCEI</i> NOCAUTES PARA TBRAD51 QUANTO AO CRESCIMENTO .....	107
6.3. ANÁLISES DE SENSIBILIDADE A AGENTES QUE CAUSAM QUEBRAS DUPLAS NO DNA DE PARASITOS <i>T. BRUCEI</i> NOCAUTES PARA RAD51 E COMPLEMENTADOS COM TcRAD51 OU TBRAD51 .....	109
6.4. ANÁLISES DE SENSIBILIDADE À CISPLATINA DE LINHAGENS <i>T. BRUCEI</i> NOCAUTES PARA RAD51 E COMPLEMENTADAS COM TcRAD51 OU TBRAD51 .....	113
6.5. EFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO EM LINHAGENS <i>T. BRUCEI</i> NOCAUTES PARA RAD51 E COMPLEMENTADAS COM TcRAD51 OU TBRAD51 .....	113
<u>DISCUSSÃO.....</u>	<u>117</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>139</u>
<u>ANEXO 1: PLASMÍDEOS.....</u>	<u>153</u>
<u>ANEXO 2: ARTIGOS.....</u>	<u>161</u>



## Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	3
Figura 2 – Evolução de cepas de <i>T. cruzi</i> . .....	6
Figura 3 – Variação antigênica em <i>T. brucei</i> . .....	11
Figura 4 – Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências. ...	13
Figura 5 – Recombinação homóloga em eucariotos .....	23
Figura 6 – Resistência dos parasitos <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> à radiação gama .....	30
Figura 7 – PCR quantitativo em tempo real para TcRad51 e TbRad51.	36
Figura 8: PFGE e <i>Southern blot</i> de DNA extraído de <i>T. cruzi</i> selvagem (WT) e transfectado com TcRad51 (Rad51) .....	65
Figura 9: <i>Northern blot</i> de parasitos selvagens e superexpressando TcRad51. ....	67
Figura 10: Sobrevivência de <i>T. cruzi</i> selvagem (WT) e superexpressando TcRad51 (Rad51) submetidos ao tratamento com zeocina .....	68
Figura 11: Curva de crescimento de <i>T. cruzi</i> selvagem e superexpressando TcRad51 submetidos à radiação gama. ....	70
Figura 13: Montagem dos vetores para deleção do gene de TcRad51. ...	74
Figura 14: Geração de heminocautes de TcRad51 em <i>T. cruzi</i> . ....	76
Figura 15: Alinhamento de sequências de DNA dos alelos de Rad51 dos parasitos selvagens e heminocautes de TcRad51 .....	77
Figura 16 – Expressão e purificação da proteína TcRad51-his. ....	79
Figura 17: <i>Western blot</i> da proteína TcRad51 utilizando anticorpos provenientes de soros de camundongos não imunizados (Não imune) e imunizados com TcRad51-his (soros 1, 2 e 3).....	80

Figura 18: *Western blot* para detecção de TcRad51 em extratos de culturas selvagens (WT) e heminocautes de TcRad51 (-/+ Rad51) na ausência de radiação (0 Gy) e 24 horas após a exposição à 500 Gy de radiação gama.. 82

Figura 19: Curva de crescimento de *T. cruzi* selvagem (WT) e heminocaute de TcRad51 (-/+Rad51) na ausência de radiação e irradiados com 500 Gy de radiação gama. .... 83

Figura 20: Imunolocalização de TcRad51 em formas tripomastigotas sanguíneas e epimastigotas de *T. cruzi*..... 85

Figura 21: Imunolocalização de TcRad51 em formas epimastigotas de *T. cruzi* antes da irradiação (Não irradiado) e diferentes tempos (1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas) após a exposição à 500 Gy de radiação gama ..... 87

Figura 22: Intensidade de fluorescência de TcRad51 do núcleo de *T. cruzi* antes e após a radiação gama ..... 88

Figura 23: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem (WT), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+ Rad51) tratados com agentes que causam *crosslinks*. .... 91

Figura 24: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem (WT), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+Rad51) tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nas doses de 0, 150, 200 e 250 µM. .... 92

Figura 25: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem transfectado com um plasmídeo expressando somente higromicina (pROCK), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+Rad51) tratados com benzonidazol nas doses de 0, 60, 120 e 240 µM..... 94

Figura 26: Análise por PCR e *western blot* de nocautes de TbRad51 em *T. brucei*. .... 96

Figura 27: Sobrevivência de *T. brucei* selvagem (WT) e nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) tratados com cisplatina nas doses de 1,7, 3,3 e 5,0 µM98

Figura 28: Sobrevivência de <i>T. brucei</i> selvagem (WT) e nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) tratados com peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) nas doses de 50, 100 e 150 µM.....	100
Figura 29: Alinhamento das sequências protéicas de TcRad51 e TbRad51.....	102
Figura 30: Análise por PCR de parasitos <i>T. brucei</i> nocautes para TbRad51 transfectados com TcRad51 ou TbRad51 .....	103
Figura 31: PCR em tempo real para análise do número de cópias integradas dos parasitos <i>T. brucei</i> nocautes para TbRad51 transfectados com TcRad51 ou TbRad51.....	105
Figura 32: <i>Western blot</i> para detecção dos níveis protéicos de TbRad51 em extratos das culturas selvagens (WT) e nocautes de TbRad51 transfectados com TbRad51 (TbRad51) na ausência (0) e presença de 0.1 µg.ml <sup>-1</sup> de fleomicina (0.1). .....	106
Figura 33: Curva de crescimento de <i>T. brucei</i> selvagem (WT), nocaute para TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51). .....	108
Figura 34: Curva de crescimento e valores de IC50 de <i>T. brucei</i> selvagem (WT), nocaute para TbRad51 (-/- Rad51) expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) para o tratamento com fleomicina .....	110
Figura 35: Curva de crescimento e valores de IC50 de <i>T. brucei</i> selvagem (WT), nocaute para TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) para o tratamento com MMS. ....	111
Figura 36: Sobrevivência de <i>T. brucei</i> selvagem (WT), nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) tratados com cisplatina nas doses de 1,7, 3,3 e 5,0 µM.....	115

Figura 37: Ensaio de eficiência de transformação de *T. brucei* selvagem (WT), nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) para verificar a taxa de recombinação ..... 116

## Abreviaturas

8-oxoG: 7,8-diidro-8-oxoguanina

AlkB: dioxigenase ferro-dependente

AP: Apurínicos/Apirimidínicos

ATP: Adenosina Trifosfato

BER: *Base Excision Repair* – Reparo por excisão de bases

BHI: *Brain Heart Infusion*

BIR: *Break-Induced Replication* - Replicação induzida por quebra

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: Albumina de soro bovino

BSD: blasticidina S deaminase

ddH<sub>2</sub>O: Água deionizada

ddNTPs: Didesoxirribonucleotídeo

DNA: Acido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo

DO: Densidade óptica

dRP: Desoxirribose fosfato

DSB: *Double Strand Break* – Quebra de fita dupla

DSBR: *Double Strand Break Repair* - Reparo de quebra dupla

dsDNA: *Double Strand DNA* – DNA de fita dupla

EDTA: Acido etilenodiaminotetracético

EPB: *Electroporation phosphate buffer*

ESP: EDTA sarcosine proteinase K

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GGR: *Global Genome Repair* – Reparo Global do Genoma

HJ: *Holliday Junction* – Junções de Holliday

HR: *Homologous Recombination* – Recombinação Homóloga

IC50: *Inhibition Concentration at 50%* - Concentração inibitória de 50%

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

kDNA: DNA do cinetoplasto

LB: *Luria Broth*

LIT: *Liver Infusion Tryptone*

LMP: *Low Melting Point*

MGMT: O-6 metilguanina alkyltransferase

MMS: Metil-metano sulfonato

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

mRNA: RNA mensageiro

NEO: neomicina fosfotransferase

NER: *Nucleotide Excision Repair* – Reparo por excisão de nucleotídeo

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*

OGG1: 7,8-diidro-8-oxoguanina glicosilase

ORF: *Open Reading Frame* - Janela aberta de leitura

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase

PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis* – Eletroforese de Campo pulsátil

Polimerase  $\beta$ : Pol  $\beta$

Polimerase  $\delta$ : Pol  $\delta$

Polimerase  $\epsilon$ : Pol  $\epsilon$

Polimerase  $\zeta$ : Pol  $\zeta$

Polimerase  $\eta$ : Pol  $\eta$

Polimerase  $\kappa$ : Pol  $\kappa$

PSG: *Phosphate saline glucose*

PUR: puromicina N-acetiltransferase

RNA: Acido ribonucléico

ROS: *Reactive Oxygen Species* - Espécies Reativas de Oxigênio

rRNA: RNA ribossômico

SDS: *Sodium Duodecil Sulfate* - Duodecil Sulfato de Sódio

SDSA: *Synthesis-Dependent Strand Annealing* – Anelamento de fita dependente de síntese

SFB: Soro Fetal Bovino

SSB: *Single Strand Break* – quebra de fita simples

SSC: *Saline Sodium Citrate Buffer*

ssDNA: *Single Strand DNA* – DNA de fita simples

TAE: Tris-acetato EDTA

TBE: Tampão Tris-borato EDTA

TCR: *Transcription-couple Repair* – Reparo acoplada a transcrição

TE: Tris-EDTA

TLS: *Translesion Synthesis* – Síntese translesão

UDGase: Uracil DNA glicosilase

UTR: *Untranslated Region* – Região não traduzida

UV: Ultravioleta

VSG: *Variant Surface Glycoprotein* - Glicoproteína de Superfície Variante

WHO: *World Health Organization*

WT: *Wild Type* - Selvagem

XGal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase

## Resumo

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. Este parasito pode resistir a altas doses de radiação gama, um agente genotóxico que causa quebras duplas no DNA. Tendo em vista esse fato, nosso grupo caracterizou em *T. cruzi* o gene codificador de uma das principais proteínas envolvidas na recombinação homóloga, e, portanto, no reparo de quebras duplas, a proteína TcRad51. Após o tratamento com a radiação gama, observa-se que os epimastigotas de *T. cruzi* apresentam uma indução da expressão protéica de TcRad51, acompanhada pela formação de focos dessa proteína no núcleo. Por outro lado, heminocautes para TcRad51 apresentam um atraso na indução da expressão protéica de TcRad51 e na formação de focos no núcleo, mostrando níveis mais baixos de fluorescência nesses locais quando comparados aos parasitos selvagens. Em parasitos superexpressando TcRad51, observa-se focos de Rad51 no núcleo mais intensos antes do tratamento com radiação gama. A localização e os níveis de Rad51 observados nas células selvagens, superexpressoras e heminocautes para TcRad51 são refletidos em fenótipos distintos de recuperação após a radiação gama. Os parasitos superexpressores de TcRad51 recuperam o crescimento antes dos parasitos selvagens enquanto os heminocautes de TcRad51 apresentam essa retomada de crescimento atrasada. Os parasitos superexpressores também apresentam uma maior resistência à zeocina, agente que causa quebras duplas, quando comparados aos parasitos selvagens. Além disso, foi verificado que a maior resistência a esses agentes corresponde a uma cinética de recuperação mais rápida do DNA fragmentado nos parasitos superexpressores, observada através de eletroforese em campo pulsátil. Com o objetivo de avaliar a contribuição de TcRad51 para a resistência a altas doses de radiação gama



apresentada pelo *T. cruzi*, foi avaliado o efeito da expressão de TcRad51 em formas sanguíneas de *T. brucei*, um tripanossomatídeo relacionado mas sensível à radiação gama. Para isso, nocautes de Rad51 foram gerados em *T. brucei* e transfectados com TcRad51 ou TbRad51. Os parasitos expressando TcRad51 apresentaram maior resistência a agentes que causam quebras duplas no DNA do que os parasitos re-expressores de TbRad51. Entretanto, os parasitos nocautes expressando TcRad51 e TbRad51 apresentaram a mesma capacidade de recombinação, avaliada através de integração de fragmentos de DNA no genoma.

O papel de Rad51 no reparo de *crosslinks* de DNA e de lesões oxidativas no DNA também foi avaliado neste trabalho. Parasitos superexpressores e heminocautes para TcRad51 apresentaram a mesma sensibilidade a agentes indutores de *crosslinks* de DNA como a luz UV e a cisplatina. Os nocautes de Rad51 de *T. brucei* não mostraram diferenças de sensibilidade à cisplatina quando comparados aos parasitos selvagens. Por outro lado, a superexpressão de Rad51 em *T. cruzi* confere maior resistência ao tratamento com água oxigenada e ao benzonidazol enquanto os heminocautes são mais sensíveis que os selvagens. Similarmente, *T. brucei* nocaute para TbRad51 mostrou-se mais sensível do que os selvagens quando tratados com água oxigenada. Portanto, Rad51 não possui um papel relevante no reparo de *crosslinks* no DNA, mas é uma proteína importante para o reparo de quebras duplas e lesões oxidativas no DNA em *T. cruzi* e *T. brucei*.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease. This parasite can resist high doses of gamma radiation, a DNA double-strand break-inducing agent. To better understand this process, our group characterized the *T. cruzi* gene encoding one of the key proteins involved in homologous recombination, and double strand break repair, TcRad51. After gamma radiation treatment, epimastigote forms increase TcRad51 protein levels, followed by foci formation of TcRad51 in the nucleus. On the other hand, TcRad51 single allele knockout cells showed a delay in the induction of TcRad51 protein levels and in the formation of TcRad51 foci that were less intense than in wild type parasites. *T. cruzi* cells overexpressing TcRad51 display more intense foci prior to gamma radiation. The localization and the levels of TcRad51 contribute to distinct phenotypes of recovery after gamma radiation treatment. Parasites overexpressing TcRad51 present a growth recovery earlier than wild type cells whereas the TcRad51 single allele knockout cells present a delay in growth recovery following irradiation. Overexpression of TcRad51 also confers an increased resistance to zeocin, another agent that cause double strand DNA breaks, when compared to wild type parasites. In addition, using pulse field gel electrophoresis (PFGE), we observed a difference in the levels of fragmentation of genomic DNA after exposition to gamma radiation, with the kinetics of chromosomal reconstitution being faster in TcRad51 overexpressing cells than in wild type cells. Aiming to evaluate the contribution of TcRad51 for the resistance to high doses of gamma radiation presented by *T. cruzi*, the effect of TcRad51 expression was evaluated in bloodstream forms of *T. brucei* parasites, which are much more sensitive to gamma radiation. Rad51 knockouts of *T. brucei*

were generated and transfected with TcRad51 or TbRad51. The parasites expressing TcRad51 showed higher resistance to agents that cause double strand breaks in DNA than the parasites re-expressing TbRad51. However, the parasites expressing TcRad51 and TbRad51 have the same recombination capacity as measured by integration of DNA fragments in the genome.

The roles of Rad51 in the repair of DNA crosslink and DNA oxidative lesions were also evaluated in this study. *T. cruzi* parasites overexpressing TcRad51 and TcRad51 heterozygous mutants have the same sensitivity to agents that induce DNA crosslink as UV light and cisplatin as wild type cells. Rad51 knockouts in *T. brucei* do not show differences in sensitivity to cisplatin compared to wild type parasites. Furthermore, overexpression of Rad51 in *T. cruzi* confers greater resistance to treatment with hydrogen peroxide and benzonidazole while TcRad51 heterozygous mutants are more sensitive than wild type cells. Similarly, Rad51 knockouts in *T. brucei* are more sensitive than wild type cells when treated with hydrogen peroxide. Therefore, Rad51 does not have a predominant role in the repair of DNA crosslink but, is a key protein for the repair of double strand breaks and DNA oxidative lesions both in *T. cruzi* and *T. brucei*.

## Introdução

### 1. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado descrito por Carlos Chagas como o agente etiológico da doença de Chagas há mais de um século. Esse parasito pertence à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastidae, na qual também estão incluídos os parasitos humanos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Essa ordem se caracteriza pela presença do cinetoplasto, uma estrutura dentro da mitocôndria única e alongada da célula, contendo grande conteúdo de DNA e 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, além de outros processos biológicos distintos dos demais eucariotos (TEIXEIRA; DAROCHA, 2003).

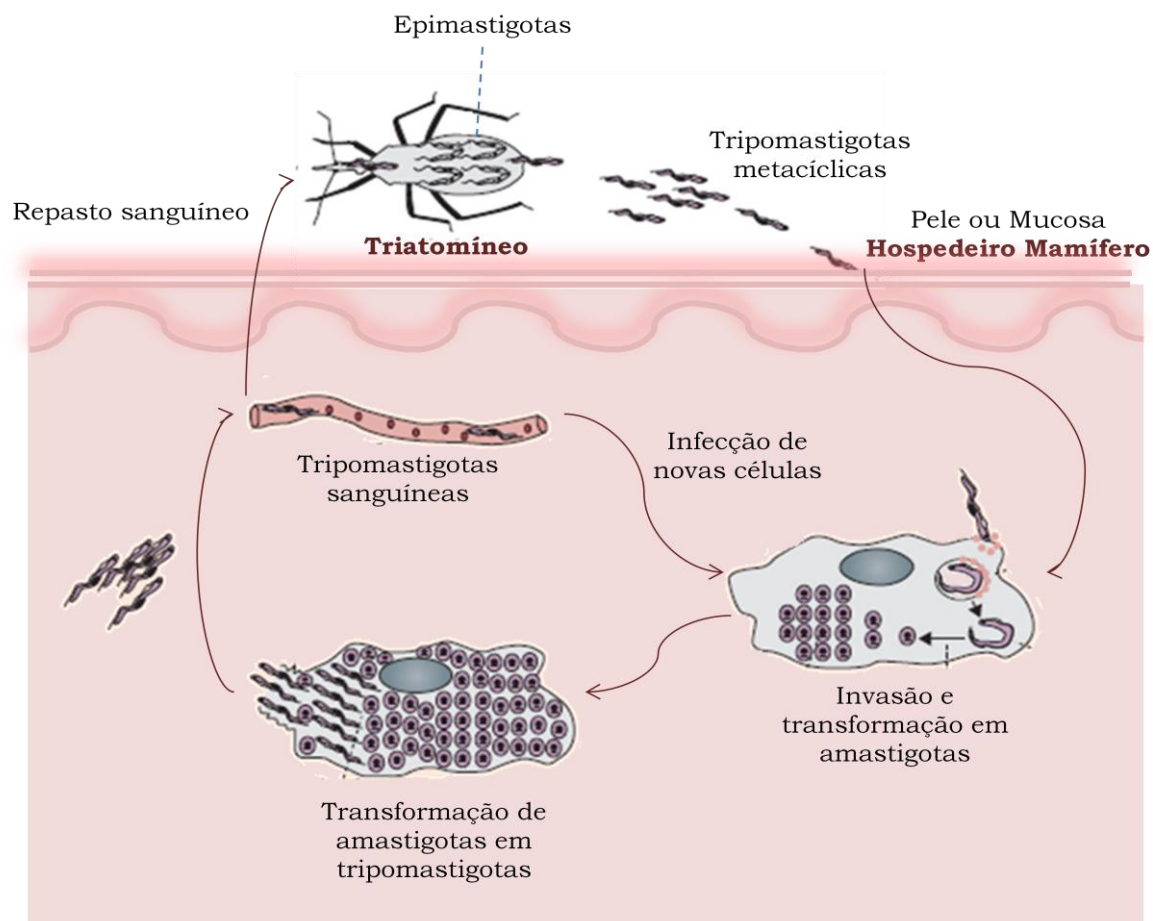
A zona endêmica da doença de Chagas abrange 21 países da América Latina. No entanto, o recente influxo de imigrantes provenientes desses países endêmicos vem tornando a doença de Chagas um problema de saúde emergente também em países não endêmicos como Estados Unidos e Espanha (SCHMUNIS, 2007). Atualmente é estimado que 10 milhões de pessoas estejam infectadas, e mais de 25 milhões estejam em áreas com risco de infecção (WHO, 2010). O tratamento da doença de Chagas é realizado através da administração de drogas nitroheterocíclicas como o benzonidazol ou nifitrimox, que precisam ser ativadas dentro do parasito. Ambas as drogas apresentam eficiência na cura e na prevenção de

manifestações crônicas, mas somente quando administrada no início da fase aguda da doença. No entanto, a eficácia do tratamento diminui ao longo da infecção (WHO, 2010).

A principal forma de transmissão do parasito para hospedeiros mamíferos, como o homem, animais domésticos e selvagens, é realizada por barbeiros hemípteros reduvídeos da subfamília Triatominae, através de ciclos doméstico, peridoméstico e silvestre que podem se sobrepor. Além disso, o homem pode ser infectado com *T. cruzi* através da transfusão de sangue e ainda por transmissão oral ou congênita. Programas de controle de vetores em larga escala e a triagem de doadores de sangue vêm reduzindo a incidência da doença de Chagas (PRATA, 2001; RASSI JR ET AL., 2010; WHO, 2010).

O ciclo de vida desse parasito alterna-se entre hospedeiros vertebrados, principalmente mamíferos, e insetos Reduviídeos hematófagos, 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 (PRATA, 2001) (Figura 1).

A doença de Chagas é reconhecida pela organização mundial de saúde (ou WHO, do inglês *World Health Organization*) como uma das doenças tropicais mais negligenciadas (KEALEY; SMITH, 2010). Ela apresenta uma grande variabilidade clínica em humanos. Inicialmente, a doença se



**Figura 1 – Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*.** O ciclo de vida deste parasito 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. Adaptado de Rassi Jr e colaboradores (2010).

caracteriza por uma alta parasitemia culminando com a disseminação do protozoário em diversos tecidos. Nessa fase que dura de 4 a 8 semanas, os indivíduos são assintomáticos ou apresentam sintomas leves como febre, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos, edema subcutâneo, e, no caso particular de transmissão por vetores, os sinais da porta de entrada do *T. cruzi* através da pele (chagoma) ou através das mucosas oculares (Sinal de Romana). Tratamento com drogas tripanomicidas como o benzonidazol, nessa fase, pode permitir a cura da infecção aguda e prevenir manifestações crônicas. 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 (PRATA, 2001; RASSI JR ET AL., 2010; WHO, 2010).

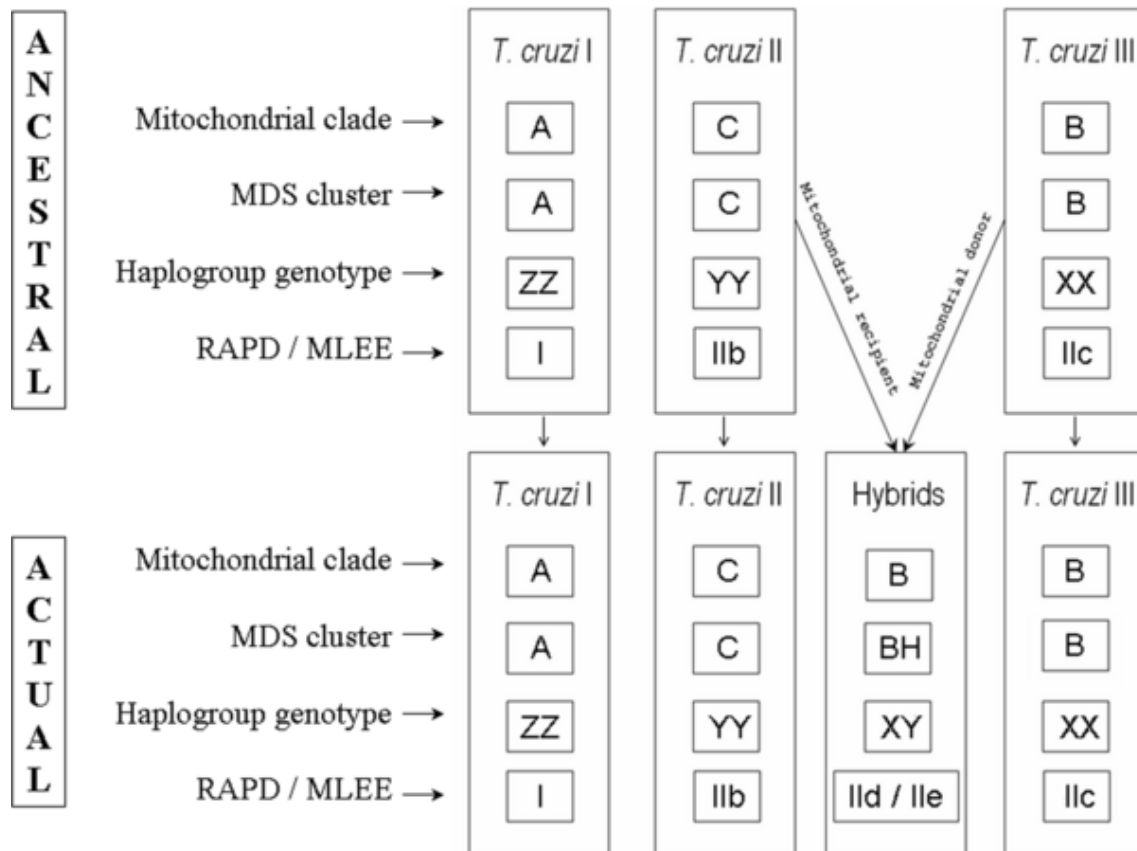
### **1.1. Diversidade genética da espécie *Trypanosoma cruzi***

O *T. cruzi* tem sido alvo de estudos que mostram uma grande diversidade das cepas com relação à aspectos morfológicos (formas delgadas, largas e intermediárias), taxa de crescimento, constituição antigênica, patogenicidade, potencial infectivo, suscetibilidade a droga, número e tamanho de cromossomos e conteúdo de DNA (BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003).

Tendo em vista essa grande variabilidade, estudos foram realizados utilizando diferentes marcadores, na tentativa de agrupar as cepas e encontrar padrões biológicos relacionados a variantes da doença. Dessa forma, inicialmente foram definidas duas principais linhagens: *T. cruzi I* e *T. cruzi II*, porém outras subdivisões também foram sugeridas (BRISSE ET AL., 2000; MILES ET AL., 1977; SOUTO ET AL., 1996). Uma das características apresentadas por essas linhagens são os distintos nichos ecológicos que ocupam. Há fortes evidências da associação de *T. cruzi II* com a doença humana (principalmente no cone sul), enquanto *T. cruzi I* é encontrado preferencialmente no ciclo silvestre, afetando marsupiais e edentados (ZINGALES ET AL., 1999). Estudos utilizando marcadores como microsatélites, genes mitocondriais e nucleares, rDNA 24Sα, dentre outros, indicaram a existência de uma terceira linhagem denominada *T. cruzi III* (AUGUSTO-PINTO ET AL., 2003; DE FREITAS ET AL., 2006; MACHADO; AYALA, 2001; ROBELLO ET AL., 2000) (Figura 2). Apesar dessa classificação, algumas cepas, incluindo as de caráter híbrido, ainda não puderam ser agrupadas em nenhuma das linhagens identificadas. Recentemente, foi definida a inclusão de três novos grupos: *T. cruzi IV*, *V* e *VI*, nos quais as cepas não classificadas foram agrupadas (ZINGALES ET AL., 2009).

As cepas consideradas híbridas da espécie *T. cruzi* possuem incongruência em árvores genealógicas baseadas em marcadores nucleares e mitocondriais, o qual não é esperado quando o organismo está sob clonalidade estrita. Essas observações indicam a provável ocorrência de troca genética nessa espécie (MACHADO; AYALA, 2001). Além disso, Gaunt e colaboradores





**Figura 2 - Evolução de cepas de *T. cruzi*.** Diagrama do modelo proposto por Freitas e colaboradores (2006) para evolução de cepas de *T. cruzi* ilustrando a variabilidade genética desse parasito.

(2003) demonstraram que o *T. cruzi* é capaz de realizar fusão celular com a consequente duplicação do genoma e formação de híbridos. Após a formação dos híbridos, podem ocorrer processos de perda de material genético e recombinação entre os genomas (GAUNT ET AL., 2003). Estudos do nosso grupo sugerem que os híbridos surgiram através de eventos de hibridização entre parasitos das linhagens *T. cruzi* II e III, sendo que o último seria o doador do material citoplasmático (evidenciado pelo DNA mitocondrial) e ambos do material nuclear (DE FREITAS ET AL., 2006) (Figura 2). No entanto, essas hibridizações seriam raras e, através da reprodução clonal, esses genótipos seriam estabilizados ao longo do tempo (MACHADO; AYALA, 2001).

Devido à prevalência da reprodução assexuada nesse organismo, a divergência clonal é um dos principais fatores na geração da diversidade entre as cepas de *T. cruzi*. 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 (TIBAYRENC ET AL., 1986). Além disso, em organismos assexuados é esperada grande divergência entre alelos como resultado do acúmulo independente de mutações. Tal fenômeno foi denominado “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 à ação da troca genética, da conversão gênica e da recombinação mitótica (MACHADO; AYALA, 2001).

Apesar da sua ocorrência em *T. cruzi*, a troca genética não explica o excesso de alelos homozigotos, pois, analisando-se os genótipos das cepas híbridas observa-se a presença de heterozigose para a maioria dos genes analisados. A presença de homozigose sem que ocorra troca genética 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* também tenha sido resultado da conversão gênica e recombinação mitótica. Dessa forma, o estudo do processo de recombinação em *T. cruzi* pode ser muito informativo para o entendimento da enorme variabilidade genética dentro da população desse parasito.

## **1.2. Mecanismos de geração de variabilidade**

Além do grande polimorfismo populacional discutido na seção anterior, 50% do genoma de *T. cruzi* é composto de sequências repetitivas sendo em sua maioria retrotransposons, repetições subteloméricas e um grande número de famílias gênicas de proteínas de superfície que interagem com moléculas do hospedeiro (EL-SAYED ET AL., 2005). Uma vez dentro do hospedeiro, o *T. cruzi* rapidamente invade uma variedade de tipos celulares do hospedeiro onde se multiplica longe da resposta imune humoral do hospedeiro (PIACENZA ET AL., 2009). Dessa forma, um repertório variável de moléculas de superfície e componentes antigênicos altamente polimórficos é essencial para que a população de *T. cruzi* obtenha sucesso no processo de invasão celular e na sobrevivência do parasito.

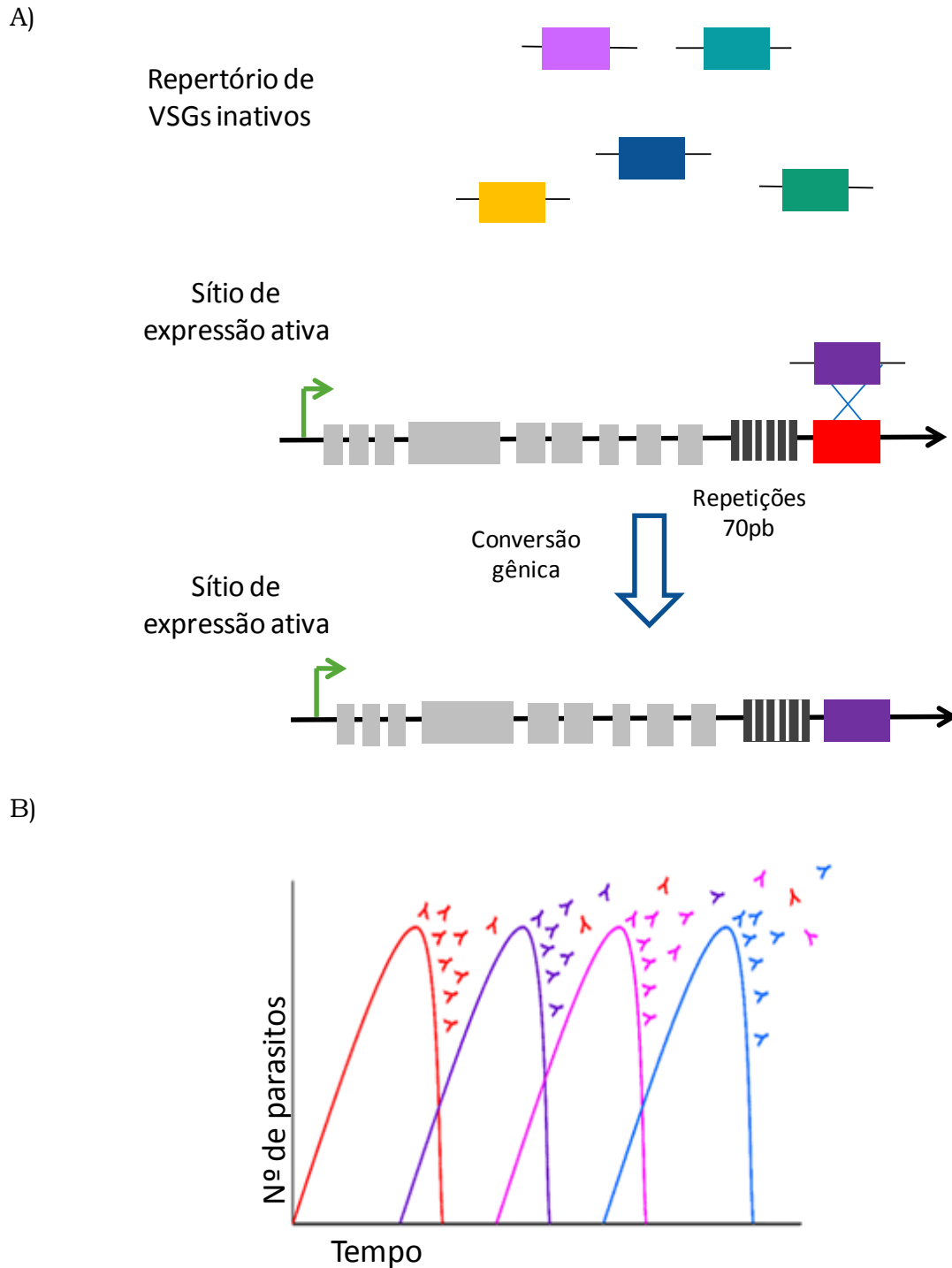
A base genética para a existência de diversidade de sequência dentro de famílias multigênicas de proteínas de superfície inclui fatores como taxas de

mutação, presença de elementos transponíveis, conversão gênica e recombinação mitótica. Membros de famílias multigênicas que são organizados em tandem são sujeitos a uma evolução interdependente de todos os membros devido à conversão gênica. No entanto, quando essas sequências não são suficientemente similares devido ao acúmulo de mutações, a conversão gênica não é mais efetiva e esses genes passam a evoluir independentemente. Portanto, mutação e conversão gênica são os fatores principais que influenciam na diversidade de famílias multigênicas sendo que a primeira aumenta a divergência entre as regiões duplicadas enquanto a última diminui. Um exemplo de família gênica organizada em tandem e relacionada à evasão imune do hospedeiro são as famílias gênicas de proteínas de superfície mucina que são altamente glicosiladas e recobrem grande parte da superfície do parasito (AZUAJE ET AL., 2007; BARTHOLOMEU ET AL., 2009; CERQUEIRA ET AL., 2008; JACKSON, 2007).

Por outro lado, a família multigênica de proteína de superfície denominada MASP possui uma organização genômica onde os genes de MASP são intercalados com outras famílias gênicas de proteína de superfície, evitando a homogeneização de sequências pela conversão gênica. Além do grande repertório dessas famílias de proteína de superfície polimórficas, *T. cruzi* combina sequências de diferentes genes, possivelmente através de conversão gênica segmental. Esse mecanismo é favorecido pelo agrupamento de genes de proteínas de superfície em uma mesma região do genoma. Além disso, evidências como a presença de um grande número de retrotransposons e pseudogenes indicam que a região onde se encontra os genes que codificam as proteínas de superfície de *T. cruzi* sofre rearranjos. Além disso, o tamanho da região onde se situam esses genes em *T. cruzi* é menor que regiões

sintênicas em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania*, indicando mais uma vez que essa região em *T. cruzi* é passível de frequentes rearranjos. Dessa forma, eventos de recombinação dentro e entre as famílias gênicas podem gerar um repertório ilimitado de proteínas do parasito exposto ao hospedeiro (BARTHOLOMEU ET AL., 2009). A geração dessa grande variabilidade de proteínas de superfície de *T. cruzi* representa um mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro, através de uma série de ativações espúrias e ineficientes de células T CD8+, resultando em atraso de uma resposta imune efetiva na fase inicial da infecção (TARLETON, 2007).

Em contraste com *T. cruzi*, o mecanismo de geração de variabilidade e evasão do sistema imune em *T. brucei*, conhecido como variação antigênica, vem sendo amplamente estudado (Figura 3). O parasito *T. brucei* é o agente etiológico da doença do sono que é transmitido através da picada da mosca Tse-tse. Esse parasito se reproduz extracelularmente no hospedeiro mamífero e não possui estágio intracelular, sendo, portanto, exposto ao constante ataque da imunidade humoral mediada por anticorpos. Ele possui em sua superfície um revestimento protetor composto por glicoproteínas denominadas glicoproteínas de superfície variante (ou VSG do inglês *Variant Surface Glycoprotein*). Ao longo da infecção, os parasitos expressam um único tipo de VSG que é trocado periodicamente por uma VSG imunologicamente distinta, o que possibilita a evasão do sistema imune direcionado contra a VSG anterior, prolongando a infecção. O tipo de VSG que está sendo expresso é encontrado em regiões denominadas sítios de expressão ativa e se localizam próximo aos telômeros. Além da VSG expressa, há mais de 1.000 VSGs inativas que são encontradas em regiões internas dos cromossomos. Um dos mecanismos



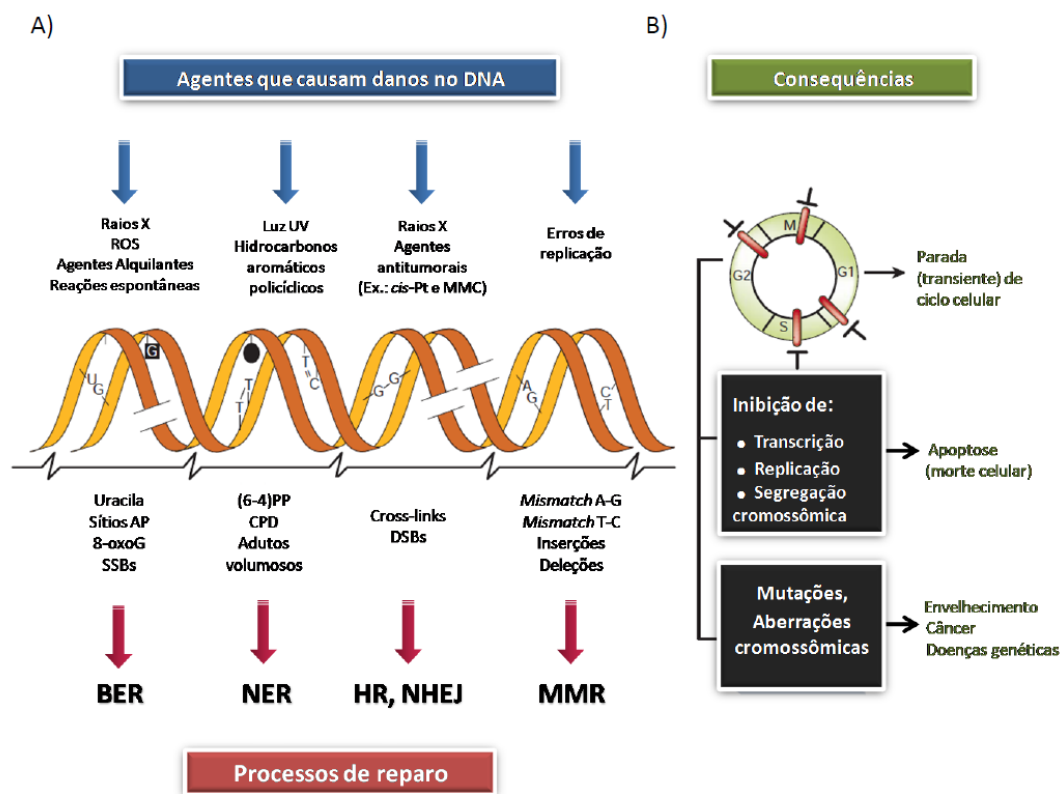
**Figura 3 – Variação antigênica em *T. brucei*.** A) A conversão gênica copia uma VSG inativa (*box* roxo) para um sítio de expressão ativa substituindo a VSG presente (*box* vermelho). B) Um animal infectado com *T. brucei* expressando a VSG “vermelha” rapidamente gera uma resposta protetora de anticorpos que resulta na eliminação da maioria dos parasitos expressando o antígeno “vermelho”. No entanto, alguns parasitos podem trocar para a VSG “roxa”, podendo então proliferar até serem eliminados por anticorpos contra esse tipo de VSG. Nesse período, alguns parasitos trocaram para um terceiro tipo de VSG e esse ciclo se repete indefinidamente .

responsáveis pela troca de VSG expressa é a recombinação que possibilita a translocação de uma VSG inativa para o sitio de expressão ativa. Além disso, eventos de recombinação podem criar novas VSGs a partir de VSGs silenciosas ou pseudogenes de VSGs (MACHADO; AYALA, 2001; MCCULLOCH; HORN, 2009; STOCKDALE ET AL., 2008).

## **2. Reparo de DNA em tripanossomatídeos**

Os principais aspectos envolvidos na geração de variabilidade em *T. cruzi*, como a taxa de mutação e recombinação homóloga, estão diretamente relacionados com a manutenção da estabilidade genômica desses parasitos. O reparo de DNA é fundamental para a manutenção da fidelidade do genoma e evitar, dessa forma, a fragmentação cromossômica ou rearranjo, carcinogênese em organismos multicelulares e, potencialmente, a morte celular (HAKEM, 2008).

O DNA é suscetível a diversos danos devido à ação de agentes genotóxicos endógenos e exógenos, bem como à instabilidade intrínseca das moléculas de DNA (HOEIJMAKERS, 2001). Agentes endógenos são principalmente os subprodutos das vias metabólicas, tais como o metabolismo oxidativo, que resulta em moléculas reativas de oxigênio (ou ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) (peróxido de hidrogênio, peróxidos e radicais hidroxila), metilação e alquilação (MARNETT; PLASTARAS, 2001; PLUSKOTA-KARWATKA, 2008). Agentes exógenos ou fatores ambientais, como radiação ionizante (raios X e raios  $\gamma$ ), UV (ultravioleta) e agentes químicos podem causar danos às bases de DNA, *crosslinks* e quebras duplas das ligações fosfodiéster. A instabilidade na ligação glicosídica entre a pentose e o anel da base pode causar a perda da base, o que resulta em bases apurínicas ou apirimidínicas (ou sítios AP) (Figura 4).



**Figura 4 – Danos no DNA, mecanismos de reparo e consequências.** A) Exemplos de agentes que causam danos no DNA (porção superior), algumas lesões geradas por estes agentes (porção média) e mecanismos de reparo mais relevantes responsáveis por sua remoção ou correção (porção inferior). B) Porção superior: efeitos agudos de danos no DNA na progressão do ciclo celular, que resultam em atraso em G1, S, G2 e M. Porção média: efeitos agudos no metabolismo de DNA, que resultam em morte celular. Porção inferior: consequências em longo prazo de injúrias no DNA, que incluem modificações permanentes na sequência de DNA (mutações de ponto, que afetam genes individuais, ou aberrações cromossômicas, que envolvem largas porções do cromossomo e podem afetar múltiplos genes) e seus efeitos biológicos. Abreviações: cis-Pt e MMC, cisplatina e mitomicina C, respectivamente (ambos fazem *crosslinking* com DNA); (6-4)PP e CPD, fotoproducto 6-4 e dímero de ciclobutano pirimidina, respectivamente (ambos induzidos por luz UV). (Furtado, 2009 - Figura adaptada de (HOEIJMAKERS, 2001)).



Finalmente, alguns processos na célula criam danos no DNA deliberadamente, tais como a imunoglobulina e o receptor de células T em mamíferos, e meiose em muitos eucariotos (HOEIJMAKERS, 2001). Dada a diversidade das formas de danos no DNA, muitas vias de reparo de DNA são usadas, tais como: (1) sanitização do *pool* de nucleotídeos, (2) a reversão direta das modificações de base, ou (3) retirada de (i) bases incorporadas erroneamente no DNA recém-replicado pelo reparo de erro de pareamento (ou MMR do inglês *Mismatch Repair*), (ii) danos volumosos por meio de reparo por excisão de nucleotídeos (ou NER do inglês *Nucleotide Excision Repair*), e (iii) bases oxidadas ou incorporadas erroneamente pelo reparo por excisão de base (ou BER do inglês *Base Excision Repair*). O DNA também é suscetível a *crosslinks* no DNA, quebras de fita simples (ou SSBs do inglês *Single Strand Breaks*) e quebras duplas (ou DSBs do inglês *Double Strand Breaks*), que podem ser reparados por recombinação homóloga (ou HR do inglês *Homologous Recombination*) e *non homologous end joining* (NHEJ). Mesmo que estes mecanismos reparem a maioria das lesões do DNA, alguns dos danos permanecem, levando a mutações ou ao bloqueio da maquinaria de replicação. DNA polimerases alternativas podem ignorar essas lesões de forma livre de erros ou propenso a erros usando um processo conhecido como síntese translesão (ou TLS do inglês *Translesion Synthesis*) (HOEIJMAKERS, 2001).

O sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major* revelou a presença de grande parte dos genes das principais vias de reparo de DNA, indicando que esses organismos podem ser capazes de realizar a maioria delas (BERRIMAN ET AL., 2005; EL-SAYED ET AL., 2005; IVENS ET AL., 2005).

Dois mecanismos de reparo direto estão presentes nesses três organismos citados acima: reversão de alquilação e reparo do dano oxidativo

(BERRIMAN ET AL., 2005; EL-SAYED ET AL., 2005; IVENS ET AL., 2005), através da ação das enzimas O-6 metilguanina alkyltransferase (MGMT) e dioxigenase ferro-dependente (AlkB), respectivamente. O mecanismo de reparo através da fotoliase, que catalisa o reparo dos dímeros de pirimidina (SANCAR, 2008), parece estar presente em *T. brucei* e *L. major*, mas não foi encontrado um homólogo dessa enzima em *T. cruzi* (BERRIMAN ET AL., 2005; EL-SAYED ET AL., 2005; IVENS ET AL., 2005). Com relação aos mecanismos que impedem o surgimento de lesões no DNA, esses parasitos não apresentam alguns dos genes envolvidos na prevenção dos efeitos do estresse oxidativo como a catalase e glutathione peroxidase (BERRIMAN ET AL., 2005; EL-SAYED ET AL., 2005; IVENS ET AL., 2005).

O reparo de erro de pareamento corrige erros de polimerização de bases de DNA que surgem no DNA recém-replicado. Após o reconhecimento da lesão e da fita de DNA recém sintetizada que carrega o erro de replicação, o MMR pós-replicativo excisa o fragmento de DNA danificado, permite a ressíntese de DNA e a ligação dos fragmentos (SCHOFIELD; HSIEH, 2003). O MSH2, gene chave do MMR, foi caracterizado em *T. cruzi* (AUGUSTO-PINTO ET AL., 2001; AUGUSTO-PINTO ET AL., 2003; MACHADO-SILVA ET AL., 2008) e *T. brucei* (BELL; MCCULLOCH, 2003). Em *T. cruzi*, a proteína MSH2 possui três isoformas protéicas distintas e com cada uma pertencente a um haplogrupo de cepas (AUGUSTO-PINTO ET AL., 2003), o que pode gerar variações na eficiência do MMR entre os haplogrupos. Em *T. brucei*, MSH2 foi estudada juntamente com MLH1 através de mutações nesses dois genes, o que resultou em uma diminuição da atividade de MMR nuclear (BELL; MCCULLOCH, 2003). Além disso, TbMSH2 parece ter um papel adicional no reparo de dano oxidativo, independente ao MMR, dado que MLH1 não está envolvido nessa função (MACHADO-SILVA ET AL., 2008). O MMR também desempenha um

papel regulador na recombinação homóloga em *T. brucei* (BARNES; MCCULLOCH, 2007). Mutantes de MLH1 e MSH2 mostram um aumento da frequência de recombinação homóloga, tanto entre moléculas de DNA homólogas como entre sequências divergentes. No entanto, o MMR tem pouca influência na variação antigênica desse parasito, apesar desse mecanismo ser regulado pela recombinação homóloga (BELL; MCCULLOCH, 2003).

O reparo por excisão de nucleotídeos detecta a presença de distorções estruturais na dupla hélice causadas por aductos volumosos ou *crosslinks* gerados por agentes como a cisplatina e luz UV. Após a identificação da fita danificada, a área da lesão é excisada e resintetizada por DNA polimerases e posteriormente religadas (NOUSPIKEL, 2009). O sistema NER pode ser dividido em duas vias principais: reparo do genoma global (ou GGR do inglês *Genome Global Repair*), que opera nas regiões não codificantes do genoma e regiões não-transcritas de genes ativos, e reparo acoplado à transcrição (ou TCR do inglês *Transcription Coupled Repair*), que é ativado quando uma lesão está em um gene que está sendo transcrito, garantindo que genes ativos tenham maior prioridade para serem reparados que o resto do genoma (NOUSPIKEL, 2009). O genoma dos tripanossomatídeos contém a maioria dos componentes do NER, mas os mecanismos bioquímicos dessa via pode apresentar algumas diferenças de eucariotos superiores. Alguns genes estão duplicados, como por exemplo, os genes XPD e DDB1 em *T. cruzi*. Enquanto outros não puderam ser identificados, como é o caso de XPA. Além disso, esses organismos podem apresentar um mecanismo de ligação diferente dos demais organismos, uma vez que não foi encontrado um homólogo para ligase III, uma proteína que desempenha um papel chave no passo final dessa via (PASSOS-SILVA *et al*, 2010).

BER é capaz de lidar com uma ampla gama de lesões que modificam bases individuais, sem grandes efeitos sobre a estrutura de dupla hélice. Tais modificações sobre as bases do DNA podem surgir como resultado da oxidação, alquilação e desaminação. A via do BER consiste em várias etapas: reconhecimento de bases danificadas, remoção, clivagem do esqueleto açúcar-fosfato, excisão de sítios AP, síntese de DNA e ligação (ROBERTSON ET AL., 2009). Os tripanossomatídeos *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* possuem as enzimas necessárias para executar o BER eficazmente (BERRIMAN ET AL., 2005; EL-SAYED ET AL., 2005; IVENS ET AL., 2005). Algumas glicosilases já foram caracterizadas, como a Uracyl-DNA glicosilase de *T. cruzi* (TcUNG) e um homólogo funcional da glicosilase 7,8-diidro-8-oxoguanina (OGG1) em *T. cruzi* (Furtado *et al*, em preparação). A AP endonuclease 1 de *T. cruzi* e *L. major* também foram caracterizadas. Ambos conferiram resistência a agentes oxidantes e alquilantes nesses organismos e foram capazes de complementar eficazmente *Escherichia coli* deficiente em AP endonuclease (GALLEGO ET AL., 2005; PÉREZ ET AL., 1999; VIDAL ET AL., 2007). Quanto às polimerases, polimerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) de *T. cruzi* e *T. brucei* se localizam no cinetoplasto do parasito e apresentam polimerização de DNA e 5'dRP atividade liase (LOPES ET AL., 2008; SAXOWSKY ET AL., 2003; VENEGAS ET AL., 2009). A localização celular destas polimerases destaca uma característica importante do kDNA (DNA do cinetoplasto) em kinetoplastídeos. Esses organismos possuem uma única mitocôndria, dentro da qual se localiza o DNA mitocondrial (kDNA) em uma região formada por uma rede condensada de centenas de maxicírculos e milhares de minicírculos. Dessa forma, devido à presença de uma única mitocôndria e da complexidade da estrutura do kDNA, é necessário um mecanismo de replicação distinto de eucariotos superiores (KLINGBEIL ET AL., 2002).

NHEJ e HR estão envolvidos principalmente no reparo de quebras duplas de DNA. Como o nome sugere, a HR requer sequências homólogas para reparar a quebra dupla, mantendo a integridade da sequência, enquanto NHEJ não utiliza de homologia entre as sequências, podendo resultar em perda de algumas bases durante o reparo. O NHEJ se inicia pelo processamento da DSB pelo complexo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1), e posteriormente as proteínas Ku70 e Ku80 mediam a junção dessas fitas. Na etapa final, DNA ligase IV, com os seus parceiros de ligação XRCC4 (Lif1 em leveduras) e XLF (também chamado de Cernunnos), religam as fitas (HUERTAS, 2010). NHEJ parece estar ausente em tripanossomatídeos dado que foi identificado somente o complexo MRN, envolvido em diversas funções no metabolismo de DNA, e as proteínas Ku70 e Ku80 no genoma desses organismos. Estudos em *T. brucei* mostraram que Ku70 e Ku80 atuam na manutenção dos telômeros (CONWAY; MCCULLOCH; ET AL., 2002)(BURTON ET AL., 2007), uma função distinta daquela envolvida em NHEJ (WILLIAMS; LUSTIG, 2003). No entanto, os mutantes de KU70 e KU80 não são mais sensíveis aos agentes nocivos ao DNA, sugerindo que eles não estão envolvidos no reparo de DNA neste organismo. Esses resultados juntamente com a ausência de alguns genes nesses organismos sugerem uma de duas possibilidades: NHEJ está ausente, ou seus componentes catalíticos foram modificados a ponto de não serem reconhecidos por similaridade. A HR será abordada em maior detalhe na próxima seção.

Algumas lesões no DNA podem bloquear as polimerases replicativas  $\delta$  e  $\epsilon$  (Pol $\delta$  e Pol $\epsilon$ , respectivamente), causando o travamento da forquilha de replicação. A parada dessa forquilha leva a monoubiquitinação do PCNA pelo complexo Rad6/Rad18, promovendo a mudança de DNA polimerase replicativa

para DNA polimerase de translesão, que catalisa a inserção de nucleotídeos opostos a lesão. Então, a DNA polimerase zeta (Pol $\zeta$ ) estende nucleotídeos pareados com a lesão. Após a etapa de extensão, ocorre o retorno das DNA polimerases replicativas para finalizar a síntese de DNA (LEHMANN ET AL., 2007). Os genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* codifica para uma grande variedade de proteínas da síntese translesão. Polimerase  $\kappa$  (Pol $\kappa$ ), Pol $\eta$ , Rev1 e homólogos Pol $\zeta$  são encontrados nestas espécies, além do PCNA e homólogos Rad6. Pol $\eta$  de *T. cruzi* é capaz de sintetizar nucleotídeos frente a lesões causadas pela UV e lesões oxidativas e se localiza no núcleo (MOURA ET AL., 2009). Por outro lado, uma das cópias da Pol $\kappa$  se localiza na mitocôndria do *T. cruzi* (RAJÃO ET AL., 2009), realiza translesão frente a 7,8-diidro-8-oxoguanina (8oxoG) (*in vitro*) e podem participar na síntese de DNA em intermediários da recombinação como o *D-loop*. Além disso, a superexpressão de Pol $\kappa$  em *T. cruzi* também confere maior resistência a agentes que causam DSBs que são reparadas principalmente por recombinação homóloga (RAJÃO ET AL., 2009). Um estudo recente mostrou que a outra cópia de Pol $\kappa$  de *T. cruzi* tem localização nuclear (Rajão, resultados não publicados). TLS desempenha um papel na reparação dos danos no DNA que bloqueia a forquilha de replicação, resgatando assim a célula da morte. Isso explica o aumento de sobrevivência dos parasitos *T. cruzi* superexpressando Pol $\kappa$  e Pol $\eta$  quando expostos ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e no caso de Pol $\kappa$  à agentes que causam DSBs. Além disso, o TLS pode gerar mutações no DNA, porque ele trabalha de uma forma passível de erro. Isso pode estar relacionado com a geração de variabilidade genética em parasitos, um processo importante para a aquisição de novidade evolutiva e de adaptação ao estilo de vida parasitária.

Os *crosslinks* de DNA envolvendo as duas fitas de DNA (*inter-strand*) que podem ser gerados pela ação de agentes genotóxicos como a cisplatina são reparados através da interação de múltiplas vias. Essas lesões são inicialmente reconhecidas e reparadas pelo NER, que permite o desprendimento do *crosslink* de uma das fitas através da excisão de um fragmento de uma das fitas. Em seguida, a maquinaria da HR (principalmente na fase S onde ocorre o bloqueio da forquilha de replicação) ou TLS é recrutada para que ocorra a síntese dessa fita que foi excisada. Posteriormente, o oligonucleotídeo contendo o *crosslink* é excisado, liberando a outra fita para preenchimento do *gap* e o término do reparo (LEHOCZKÝ ET AL., 2007).

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

A recombinação homóloga (HR) é a troca ou transferência de informação entre sequências de DNA homólogas e foi encontrada em todos os organismos estudados. HR possui papéis essenciais na meiose e mitose. Na meiose, a função primária da recombinação é estabelecer uma conexão física entre cromossomos homólogos e garantir sua correta segregação na primeira divisão meiótica. Além disso, a recombinação meiótica contribui para a diversidade através da geração de novos rearranjos entre genes. Na mitose, HR garante às células o reparo fidedigno de quebras duplas de DNA (DSBs) que são formadas como resultado do colapso da forquilha de replicação, de processamento de danos no DNA e exposição a agentes genotóxicos. As DSBs são uma grande ameaça à estabilidade genômica e o fracasso no reparo dessas lesões pode resultar em perda cromossômica, rearranjos, apoptose, carcinogênese ou morte. Além do reparo de DSBs, HR também está envolvida na manutenção da estabilidade genômica através da manutenção de telômeros na ausência da

telomerase, do reparo de *crosslinks* de DNA e do reparo de DSBs que iniciam rearrranjos programados como a troca de *mating-type* in *Saccharomyces cerevisiae* e recombinação V(D)J das imunoglobulinas (GASIOR ET AL., 2001; LI; HEYER, 2008; MOYNAHAN; JASIN, 2010; SAN FILIPPO ET AL., 2008; SYMINGTON, 2002).

A recombinação homóloga pode ser dividida em três etapas: iniciação (ou pré-sinapse), onde a quebra dupla é preparada para recombinação, troca de fitas (sinapses), onde a extremidade da DSB invade a molécula de DNA intacta através das regiões de homologia de sequência, e resolução (pós-sinapse), onde os intermediários da recombinação são separados e a DSB é reparada (LI; HEYER, 2008; SAN FILIPPO ET AL., 2008).

Em linhas gerais, a recombinação se inicia após a quebra de fita dupla de DNA (Figura 5). A extremidade 3' dessas fitas é processada, através da ação de nucleases e helicases denominadas: Mre11, Rad50 e Xrs2 (o complexo MRX, também chamado de complexo MRN em mamíferos – Mre11, Rad50, Nbs1), 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. 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. Esse nucleofilamento auxilia na busca por homologia e no pareamento das sequências de DNA para finalmente promover a troca de fitas (LI; HEYER, 2008; SYMINGTON, 2002).

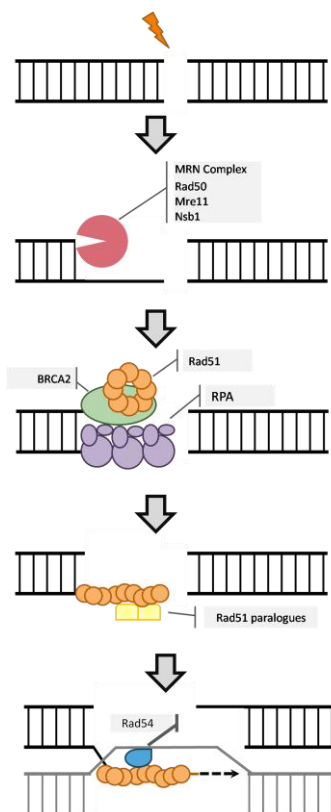
A polimerização de recombinases no DNA de fita simples (ou ssDNA do inglês *single strand DNA*) é um processo limitante que pode ser auxiliada pelos



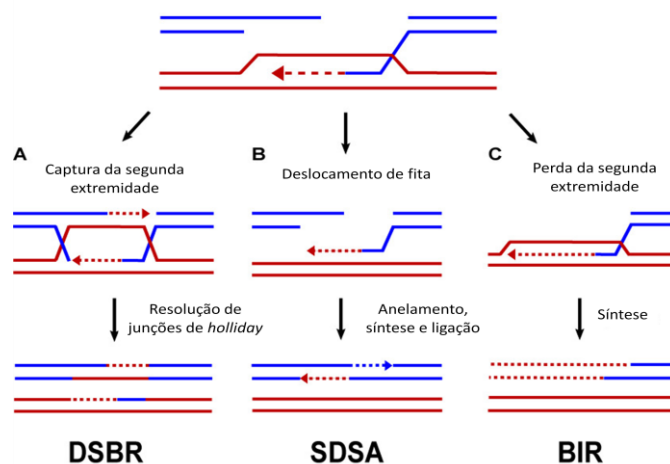
mediadores de recombinação, tais como: parálogos de Rad51 (heterodímero de Rad55 e Rad57 em *Saccharomyces cerevisiae* e Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2, Xrcc3 em humanos), Rad59, TID1/Rad54b e Brca2 (ausente em leveduras). Esses fatores podem acelerar o deslocamento de RPA da ssDNA por Rad51 ou estabilizar o complexo pré-sinapse (LI; HEYER, 2008; SYMINGTON, 2002).

A reação de troca de fita de DNA é facilitada pela proteína Rad54 (MAZIN ET AL., 2010). Rad54 é uma proteína motora que promove o pareamento do DNA homólogo, a troca de fita de DNA e ajuda na reciclagem das recombinases, removendo-as do DNA de fita dupla antes e após a etapa de invasão de DNA (FORGET; KOWALCZYKOWSKI, 2010). Após o pareamento entre as sequências homólogas, a DNA polimerase é responsável pela polimerização da extremidade 3' da fita de invasão. Pelo menos três vias distintas foram propostas após a formação do intermediário *D-loop*. Anelamento de fita dependente de síntese (ou SDSA do inglês *Synthesis-Dependent Strand Annealing*), onde a fita invasora se solta após a síntese de DNA e anela com a segunda extremidade, levando a uma conversão localizada sem *crossover*. Esse processo pode envolver múltiplos ciclos de invasão, síntese e liberação da fita. Replicação induzida por quebra (ou BIR do inglês *Break-Induced Replication*), onde o *D-loop* é reunido dentro de uma forquilha de replicação completa, copiando toda a parte distal do cromossomo, resultando em perda de heterozigosidade. E por último, reparo de quebra dupla (ou DSBR do inglês *Double Strand Break Repair*), onde ambas as extremidades da DSB são envolvidas no *D-loop*, por invasão independente da fita ou por captura da segunda extremidade, levando a formação das junções

A)



B)



**Figura 5 – Recombinação homóloga em eucariotos** A) 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/BRCA2. O nucleofilamento formado pela fita simples de DNA e Rad51 é estabilizado pelos parálogos de Rad51. 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)). B) Pelo menos três vias podem ser sugeridas após o intermediário *D-loop* ser formado. Em DSBR, ambas as extremidades de uma DSB estão envolvidos levando a formação das junções de Holliday. A junção pode ser processada por resolvases. Em SDSA, a fita invasora é deslocada após a síntese de DNA e anelada com a segunda extremidade, levando a uma conversão localizada. Em BIR, o *D-loop* é montado dentro de uma forquilha de replicação, copiando a parte distal inteira de um cromossomo resultando em perda de heterozigidade (Figura adaptada de (BARLOW; ROTHSTEIN, 2010)).

de Holliday (ou HJs do inglês *Holliday Junctions*). Então, as HJs são resolvidas pelos heterodímeros Mus81 e Mms4/Eme1, gerando produtos *crossover* ou *não-crossover* (LI; HEYER, 2008; SAN FILIPPO ET AL., 2008; SYMINGTON, 2002)(Figura 5).

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 recombinases, as quais são altamente conservadas e denominadas RecA em procariotos e Rad51 em eucariotos. Essas proteínas quando ligadas a ATP formam filamentos helicoidais, se ligando cooperativamente à ssDNA, onde o DNA é mantido em sua forma estendida. A polimerização de Rad51 na ssDNA é um fator limitante, vulnerável a competição com outros fatores como RPA, mas é auxiliado pelos mediadores de recombinação como Rad52, os parálogos de Rad51 e BRCA2. O filamento nucleoproteico Rad51-ssDNA, também chamado de filamento pré-sináptico, contém um sítio de ligação para o DNA de fita dupla (ou dsDNA do inglês *Double strand DNA*). A dsDNA é mantida transientemente dentro do sítio secundário do filamento pré-sináptico, e se a sequência homóloga não for encontrada, a fita dupla é liberada. Uma vez que a região homóloga é localizada, a captura inicial da fita dupla e o alinhamento com a molécula de ssDNA é facilitada. Inclusive, a fita complementar da fita dupla de DNA é continuamente ocupada dentro do filamento pré-sináptico para parear com ssDNA, resultando em uma extensão da migração das fitas de DNA. Portanto, nucleofilamentos de Rad51 medeiam o pareamento e a troca de fitas entre moléculas de DNA homólogas através da ligação de ATP (FORGET; KOWALCZYKOWSKI, 2010; ROCA; COX, 1990; SUNG ET AL., 2003; SUNG; STRATTON, 1996).

Vários estudos têm demonstrado a importância da proteína Rad51 na estabilidade genômica em eucariotos, através do reparo de quebra dupla de DNA (SYMINGTON, 2002). Mutantes de Rad51 de *S. cerevisiae* são viáveis, mas apresentam uma recombinação homóloga defeituosa como também uma maior sensibilidade aos agentes que danificam o DNA, incluindo o metilmetanosulfonato (MMS) (CHANET ET AL., 1996). Essa proteína também 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 (VISPÉ ET AL., 1998)(KLEIN, 2008) (Basile *et al*, 1992; Vispe *et al*, 1998; Klein, 2008). Após a exposição a esses agentes, foi observada a formação de foci de Rad51 no núcleo de células de mamífero (HAAF ET AL., 1995). Apesar de desempenhar um papel na recuperação de DNA lesionados, em vertebrados, Rad51 pode contribuir potencialmente para a instabilidade genômica causada pela hiperrecombinação (KLEIN, 2008; ORRE ET AL., 2006). De fato, a superexpressão de Rad51 foi observada em células tumorais de humanos de diferentes linhagens celulares (XIA ET AL., 1997). Estudos desenvolvidos por Schild and Wiese (2010) sugerem que os níveis aumentados de Rad51 em tumores com defeitos iniciais na recombinação homóloga limitam a instabilidade genômica durante a progressão carcinogênica. No entanto, altos níveis dessa proteína podem promover rearranjos cromossômicos e aneuploidia quando seguido de tratamento com agentes genotóxicos (RICHARDSON ET AL., 2004a). Recentemente, foi descrito um papel adicional de Rad51 na manutenção do genoma mitocondrial de células humanas. Na mitocôndria, Rad51 teria o papel de regular o número de cópias de DNA mitocondrial principalmente após o estresse oxidativo (SAGE ET AL., 2010).

## 2.2. Rad51 e a recombinação em tripanossomatídeos

O sequenciamento completo do genoma dos tripanossomatídeos *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* revelou que esses organismos possuem as principais proteínas envolvidas nos primeiros passos da HR, como Mre11, Rad50, Nsb1 e Rpa. No entanto, somente Mre11 de *T. brucei* foi caracterizado. Mutações em Mre11 prejudicam HR, aumentam a sensibilidade a danos no DNA e levam a rearranjos cromossômicos (ROBINSON ET AL., 2002; TAN ET AL., 2002). No entanto, Mre11 não contribui para a recombinação durante a variação antigênica (ROBINSON ET AL., 2002).

Brca2, parálogos de Rad51 e Rad54 são os mediadores de recombinação encontrados em tripanossomatídeos. Por outro lado, homólogos de Rad52, proteína chave da HR em leveduras, não foram encontrados nesses organismos. No entanto, não se sabe ao certo qual o impacto da ausência dessa proteína para HR. Ao contrário do mutante em levedura, no qual Rad52 possui um papel preponderante na HR, mutantes desse gene em camundongos causam somente um moderado impacto na HR e não apresentam sensibilidade à radiação ionizante (RIJKERS ET AL., 1998). Especula-se que BRCA2, o qual não é encontrado em leveduras, seja uma das prováveis proteínas que substituiriam Rad52 de levedura em células de mamíferos ou em tripanossomatídeos. A proteína BRCA2 interage com Rad51 através das repetições BRC (FORGET; KOWALCZYKOWSKI, 2010; SHIVJI ET AL., 2009) e sequências não relacionadas. BRCA2 de *T. cruzi* e *Leishmania* possuem duas repetições BRC não idênticas (HARTLEY; MCCULLOCH, 2008). Por outro lado, BRCA2 de *T. brucei* apresenta uma expansão não usual no número de repetições BRC (15 repetições BRC), e esses elementos são cruciais para a eficiência da HR e para a correta localização de Rad51. Além disso,

mutantes de BRCA2 em *T. brucei* apresentaram instabilidade genômica e diminuição da variação antigênica (HARTLEY; MCCULLOCH, 2008).

Quatro parálogos de Rad51 são codificados no genoma de *T. brucei* e *T. cruzi*, sendo que um deles não está presente em *L. major*. Rad51-3 e Rad51-5 foram caracterizados em *T. brucei* e mutantes desses genes apresentam deficiência no reparo de DNA, na integração de DNA exógenos, além do mutante de Rad51-3 diminuir a frequência da troca de VSG (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2005).

A principal etapa da HR é o pareamento entre fitas homólogas e a reação de troca de fitas que é mediada pelas recombinases, tais como DMC1 e Rad51. Ambas as enzimas estão presentes em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*. DMC1, uma recombinase putativa específica para meiose, foi estudada somente em *T. brucei*. A ausência dessa proteína não afeta o reparo realizado por HR ou a troca de VSGs nesse parasito (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2006). A presença de genes envolvidos na meiose é uma característica intrigante dos tripanossomatídeos dado que a principal forma de reprodução é a fissão binária (TIBAYRENC ET AL., 1986). Apesar de estudos demonstrarem evidências de troca genética entre populações de *T. brucei* (TAIT, 1980), *T. cruzi* (CARRASCO ET AL., 1996; GAUNT ET AL., 2003) e *L. major* (KELLY ET AL., 1991), não está claro se a presença de genes da recombinação meiótica implica que os tripanossomatídeos realizam meiose.

A recombinase Rad51 foi descrita e caracterizada nos tripanossomatídeos *T. cruzi*, *L. major* e *T. brucei* (MCCULLOCH; BARRY, 1999; MCKEAN ET AL., 2001; REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006). O parasito *L. major* é um dos agentes etiológicos da leishmaniose. 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 parasito durante a infecção, devido à exposição a danos oxidativos no DNA gerados pela resposta intracelular do hospedeiro (MCKEAN ET AL., 2001).

No parasito *T. brucei*, foi visto que Rad51 possui um papel relevante no processo de variação antigênica, o qual possibilita o escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro. 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, Glover e colaboradores (2008) demonstraram que em *T. brucei* o reparo de quebra dupla em cromossomos é realizado preferencialmente por recombinação homóloga com formação de foci de Rad51. Esses resultados indicam a contribuição desses genes para o reparo de DNA e para a recombinação homóloga.

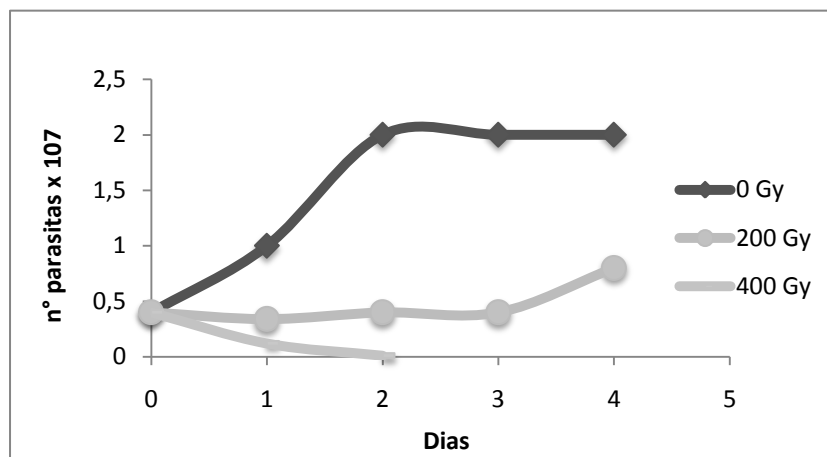
Pouco se sabe sobre o mecanismo de recombinação homóloga em *T. cruzi*. A recombinação possivelmente possui um papel relevante na biologia do parasito através da homogeneização dos alelos e na formação de híbridos (MACHADO ET AL., 2006). Nosso grupo descreveu e caracterizou a proteína Rad51 de *T. cruzi* (REGIS-DA-SILVA *et al*, 2006). 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 parasito, 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 observado 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 parasito foi submetido à radiação ionizante. Dessa forma, quando expostas à radiação gama mesmo em doses altas como 500 grays (Gy) (Figura 6B) ou 1000 Gy, os parasitos conseguem retomar o crescimento (REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006). Essa dose é cerca de 50 a 100 vezes maior que a quantidade necessária para matar outros eucariotos como plantas (JIANG ET AL., 1997), células de mamífero (VISPÉ ET AL., 1998) e o parasito *Plasmodium* (GEOGHEGAN ET AL., 2001). O parasito *T. brucei* é também mais sensível à radiação gama que o *T. cruzi*, e não consegue resistir a doses superiores a 400 Gy (Figura 6A). 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).

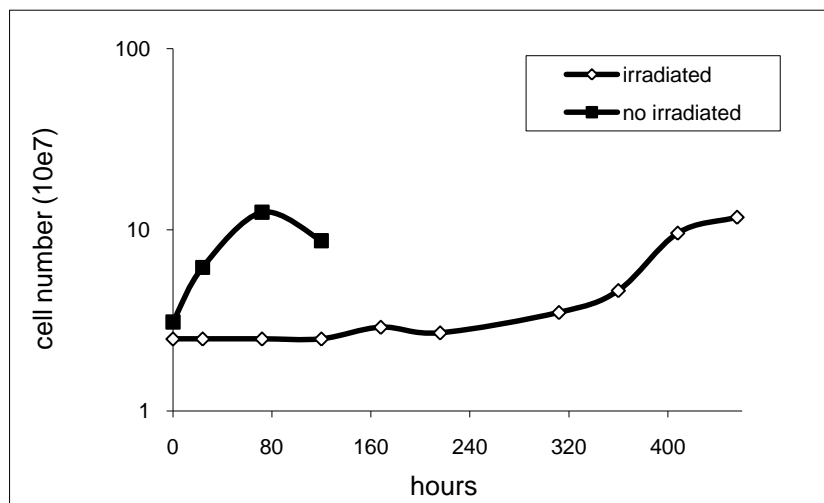
Tendo em vista esses dados, foram planejados experimentos que nos permitissem compreender melhor o papel de Rad51 no processo de recombinação em *T. cruzi* e *T. brucei*. Esse mecanismo está envolvido no reparo de diferentes danos ao DNA desse parasito e, portanto constitui um alvo importante para os estudos da biologia desses parasitos.



A)



B)



**Figura 6 - Resistência dos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei* à radiação gama.** A) Curva de crescimento do parasito *T. brucei* na ausência de radiação (0) e após tratamento com radiação gama nas doses de 100 Gy (100), 200 Gy (200) e 400 Gy (400) (Nardelli, resultado não publicado). B) Curva de crescimento do clone CL Brener na ausência de irradiação (no irradiated) e após tratamento com radiação gama na dose de 500 Gy (irradiated) (REGIS-DASILVA ET AL., 2006).

## Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é estudar o papel do gene Rad51 no reparo e recombinação de DNA em tripanossomatídeos.

Para tanto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar papel de Rad51 de *T. cruzi* e *T. brucei* na resistência a lesões oxidativas, cross-links e quebras duplas de DNA causadas por agentes genotóxicos;
- Analisar a localização de TcRad51 após tratamento com agentes que causam quebras duplas no DNA;
- Avaliar o papel de TcRad51 na resistência ao Benzonidazol;
- Comparar TcRad51 e TbRad51 quanto à eficiência de recombinação e reparo de quebras duplas de DNA.

## Material e Métodos

### 1. Iniciadores

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela companhia AlfaDNA ou Eurofins MWG Operon e estão representados na Tabela 1. Todos iniciadores foram diluídos em água miliQ e estocados em alíquotas na concentração de 200  $\mu$ M. Os iniciadores específicos para *T. cruzi* foram desenhados a partir de sequências do clone CL Brener e para *T. brucei* foram desenhados a partir de sequências da cepa 927.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados neste trabalho

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Finalidade</b>
Rad51BamH1	5' - <u>GGA TCC</u> ATG AAC ACC CGC TCC AAG - 3'	Expressão heteróloga
Rad51pETrevxho	5' - <u>CTC GAG</u> ATC CCT TGC ATC CCC AAC G - 3'	Expressão heteróloga
3'UTRRad51FwSalI	5' - <u>GTC GAC</u> CAG TGT GTA GCG TCA AAC AGC AT - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
3'UTRRad51 Rev1Sacl	5' - <u>GAG CTC</u> CGA GAA CCA ACG CAG CCC CG - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
3'UTRRad51 Rev2Sacl	5' - <u>GAG CTC</u> CAA GAA CCA ACG CAG CCC CA - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
5'UTRRad51Fw	5' - ACT TGT GCG ATG AAA TGT GC - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
5UTRFw10	5' - AGG CGA GGA GTA TGA GCC ACC - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
5'UTRRad51 Rev1XbaIHygro	5' - GTG AGT TCA GGC TTT TTC ATT <u>CTA GAC</u> ACT CCT TTT CTC ACT CTG TCT CC - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
5'UTRRad51 Rev2XbaI	5' - <u>TCT AGA</u> CAC TCC TTT TCT CAC TCT TTC TCG - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
HygroFwXbaI	5' - <u>TCT AGA</u> ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
HygroRevSalI	5' - <u>GTC GAC</u> TTA GGA TCG GGG GAT CGA - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
NeoFwXbaI	5' - <u>TCT AGA</u> ATG GGA TCG GCC ATT GAA CA - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>
NeoRevSalI	5' - <u>GTC GAC</u> TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG G - 3'	Nocaut <i>T. cruzi</i>

Rad51XbaI	5' - <u>TCT AGA</u> ATG AAC ACC CGC TCC AAG AG - 3'	Superexpressão
Rad51XhoI	5' - <u>CTC GAG</u> TAG ATC AAT CCC TTG CAT CCC -3'	Superexpressão
RTTcRad51Fw	5' - GGC TGT CAA GGG TAT CAG TG - 3'	Real time PCR
RTTcRad51Rev	5' - AAC CAC TGC GGA TGT AAA GC - 3'	Real time PCR
RTTbRad51Fw	5' - AGG TGG CAT TGA ACT TGG TAG - 3'	Real time PCR
RTTbRad51Rev	5' - ACA CAA AGG GTA TGG CAG AG - 3'	Real time PCR
TcRad51ORFFw	5' - <u>ACG CGT TCT AGA</u> ATG AAC ACC CGCTCC AAG AG - 3'	Complementação
TcRad51ORFRev	5' - <u>GAT ATC CTC GAG</u> TCA ATC CCT TGC ATC CCC AA - 3'	Complementação
TbRad51ORFFw	5' - <u>CCG GGG CTA GCA</u> TGA ACA CTC GCA CCA AAA ATA AG - 3'	Complementação
TbRad51ORFRev	5' - <u>CCC GGG CTC GAG</u> CTA GTC CCT AAC GTC TCC CA - 3'	Complementação
KO5'	5' - GAT GAT GCC GCA GTG GAT GCG G - 3'	Nocaute <i>T. brucei</i>
KO3'	5' - GCA CTT CTC CGC TTT CGG AGT G - 3'	Nocaute <i>T. brucei</i>

(1) Sítios para enzimas de restrição estão sublinhados

## 2. Manipulação de DNA

### 2.1. Extração de DNA genômico e precipitação por etanol

O DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* foi extraído através da lise celular utilizando um tampão de lise (1% SDS, 80 mM NaCl, 45 mM EDTA e Proteinase K 100 µg.mL<sup>-1</sup>) seguida por extração fenol clorofórmio. Após a incubação por 3 horas a 50°C em solução de lise, os parasitos foram submetidos à extração fenol clorofórmio que utiliza inicialmente volumes iguais de fenol e DNA. A amostra era homogeneizada e as duas fases da mistura eram separadas por centrifugação em microcentrífuga a 13000 rpm e temperatura ambiente por 5 min. A camada superior contendo o DNA era removida e transferida para um novo tubo. Esses passos foram repetidos

utilizando volumes iguais de fenol e clorofórmio (mistura 1:1) e DNA e posteriormente com volumes iguais de clorofórmio e DNA. Para a precipitação do DNA foi utilizado dois volumes de etanol 100% e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5.2. A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada por 16 horas a -20°C. O DNA foi recuperado por centrifugação a 13000 rpm, a 4 °C por 30 min. O sedimento obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70% e novamente centrifugado por 15 min, velocidade 13000 rpm, a 4°C. A solução foi removida por inversão e o sedimento foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em um volume apropriado de ddH<sub>2</sub>O.

O DNA genômico de *T. brucei* foi extraído utilizando o DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) que utiliza colunas de sílica para a purificação do DNA genômico. O protocolo foi realizado de acordo com as especificações do fabricante.

## **2.2. Amplificação de DNA por PCR**

DNA foi amplificado por PCR em um volume final de reação de 20 µl contendo: tampão da reação 1B 1 X Phoneutria (10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 75 mM KCl) ou 1 X tampão NEB (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100), 25 µM dNTP, 0,3 µM de cada iniciador e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Phoneutria ou NEB). Quando necessário uma maior fidelidade de amplificação, 0,05 unidades de PFU polimerase (Stratagene) foram adicionadas à reação ou a reação foi realizada utilizando a enzima Phusion (NEB) e seu respectivo tampão. A amplificação por PCR ocorreu em termociclador Robocycler® (Stratagene) ou TC-3000 (Techne), com as seguintes condições: desnaturação inicial por 5 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturação (95°C, 30 seg), anelamento

(55°C, 30 seg) e extensão (72°C, 1 min), seguidos de 10 min de extensão final a 72°C. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio ou SYBR safe e o tamanho do DNA amplificado foi confirmado por comparação com um padrão de peso molecular conhecido.

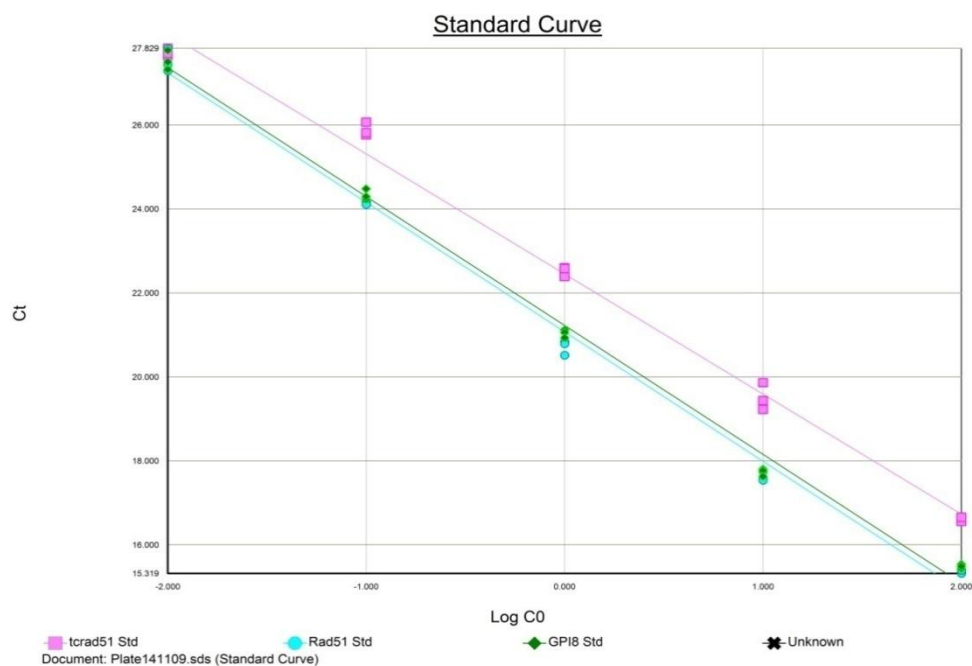
### **2.2.1. PCR de colônia de bactérias transformadas**

A análise de transformantes positivos foi realizada por PCR das colônias obtidas. Palitos estéreis foram encostados nas colônias de bactérias transformadas e introduzidos rapidamente na mistura de PCR. A reação foi realizada como descrito no item 2.2, porém em um volume final de 10 µl.

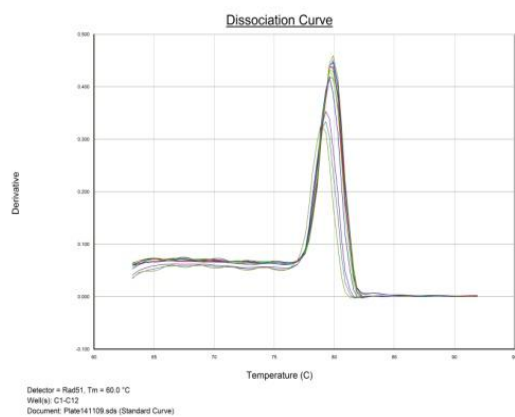
### **2.2.2. PCR quantitativo em tempo real**

O número de cópias de Rad51 das diferentes cepas foi analisado através de PCR quantitativo em tempo real do DNA genômico dessas cepas. As reações foram realizadas utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,3 µM de iniciadores. As reações foram incubadas no aparelho *ABI*PRISM® 7500 (Applied Biosystems) com o seguinte programa: dois passos iniciais de 50°C por 5 min e 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 60°C e 95°C por 1 min cada. Todas as amostras foram testadas em triplicatas em dois experimentos independentes. A qualidade dos amplicons foi avaliada pelas curvas de dissociação de cada conjunto de iniciadores (TcRad51, TbRad51 e GPI-8), as quais apresentaram um único pico (Figura 7). A eficiência de amplificação desses iniciadores foi também avaliada através de curva padrão utilizando uma diluição seriada de DNA genômico e observando a inclinação da reta ( $R$  próximo a 1) (Figura 7). A quantidade de cópias do

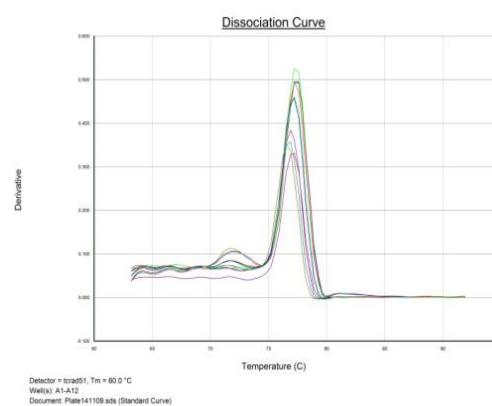
A)



B)



C)



**Figura 7 – PCR quantitativo em tempo real para TcRad51 e TbRad51.** A) Curva padrão para o cálculo de eficiência dos conjuntos de iniciadores para TcRad51 (curva em rosa), TbRad51 (curva em azul) e GPI-8 (curva em verde). B e C) Curva de dissociação dos iniciadores TbRad51(B) e TcRad51 (C).

gene Rad51 de *T. cruzi* ou *T. brucei* nas diferentes linhagens foi calculada como a quantidade de cópias relativa à linhagem selvagem. Os resultados foram então normalizados com o controle GPI-8.

### **2.3. Purificação de DNA a partir de gel de agarose**

Fragmentos amplificados por PCR ou produtos de digestão enzimática foram purificados a partir de gel de agarose 1% utilizando o kit Concert rapid gel extraction system (Gibco-BRL). O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 1% por comparação com um padrão de DNA de concentração conhecida.

### **2.4. Digestão de DNA com enzimas de restrição**

A digestão plasmidial foi realizada na proporção de 1 unidade da enzima de restrição para cada 1 µg de DNA, na presença do tampão indicado pelo fabricante a 37°C por duas horas ou durante a noite. Os fragmentos obtidos a partir de DNA plasmidial foram visualizados em gel de agarose 1% e purificados do gel utilizando o sistema descrito no item anterior.

### **2.5. Vetores plasmidianos e clonagem dos fragmentos de DNA**

Neste trabalho foram utilizados os vetores pGEM®-T Easy (Promega) (Anexo 1.1), pCR®2.1-TOPO (Anexo 1.2), pSC-B-amp (Agilent Technologies) (Anexo 1.3), pROCK (DAROCHA; SILVA; ET AL., 2004)(Anexo 1.4 e 1.5), pGEM-Rad51Hig, ΔRAD51::BSD (MCCULLOCH, resultados não publicados), ΔRAD51::PUR (MCCULLOCH; BARRY, 1999), pRM482 (Anexo 1.6) (PROUDFOOT; MCCULLOCH, 2005), pTHT (CONWAY; PROUDFOOT; ET AL., 2002) e pET21a (Novagen) (Anexo 1.7).



Os vetores pGEM®-T Easy (Anexo 1.1), pCR®2.1-TOPO (Anexo 1.2) e pSC-B-amp (Anexo 1.3) possuem gene de resistência a ampicilina para a seleção em bactérias, além de um sítio múltiplo de clonagem. Essa região permite a ligação do fragmento de DNA em uma região contendo sítios para diversas enzimas de restrição flanqueando o fragmento de interesse.

O vetor pROCK desenvolvido por DaRocha e colaboradores (2004) (Anexo 4 e 5) possui uma região que corresponde a uma parte do gene da  $\beta$ -tubulina a qual possibilita a integração desse vetor no genoma do parasito *T. cruzi*. O promotor ribossômico presente nesse plasmídeo possibilita a expressão dos genes que codificam para a proteína fluorescente verde GFP e da resistência ao antibiótico higromicina. Além disso, a presença de regiões 5' não traduzida (ou UTR do inglês *UnTranslated Region*) de TcP2 $\beta$ , 3'UTR e região intergênica de GAPDHII auxiliam no correto processamento do pré-mRNA (RNA mensageiro) e também na estabilidade do mRNA maduro. Com o objetivo de obter um vetor para superexpressão de TcRad51, foi realizada a substituição do gene que codifica para GFP pelo gene TcRad51 no pROCK, inicialmente através da digestão desse vetor com as enzimas de restrição *Xho I* e *Xba I* (Anexo 1.5).

O vetor pGEM-Rad51Hig codifica para o gene de resistência a higromicina e possui em suas extremidades regiões que flanqueiam a ORF de Rad51 em *T. cruzi*, o que possibilita a substituição da ORF de TcRad51 pelo vetor.

Os vetores  $\Delta$ RAD51::BSD (McCulloch, resultados não publicados) e  $\Delta$ RAD51::PUR (MCCULLOCH; BARRY, 1999) possuem em suas extremidades regiões do gene de Rad51 que permitem a deleção de 391 pb desse gene. O vetor  $\Delta$ RAD51::BSD (McCulloch, resultados não publicados) possui gene de

resistência a blasticidina flanqueado pela região intergênica da  $\alpha\beta$ -tubulina e da actina enquanto o vetor  $\Delta$ RAD51::PUR (MCCULLOCH; BARRY, 1999) possui o gene de resistência a puromicina flanqueado pelas regiões 5'UTR e 3'UTR do PARP.

O vetor pRM482 desenvolvido por Proudfoot & McCulloch (2005) possui em suas extremidades regiões intergênicas de  $\alpha\beta$ -tubulina, o que propicia a integração desse vetor no genoma do *T. brucei* através da substituição de uma região codificadora de  $\alpha$ -tubulina. Esse vetor também possui gene de resistência a neomicina e permite a expressão do gene de interesse através dos sinais para transcrição de tubulina. Os fragmentos de Rad51 de *T. cruzi* liberados do vetor pSC-B-amp pela digestão com as enzimas *Mlu* I e *EcoR* V foram ligados no vetor pRM482, previamente digerido com essas mesmas enzimas. Para os fragmentos de Rad51 de *T. brucei*, esses foram liberados do vetor pSC-B-amp pela digestão com a enzima *Sma* I e foram ligados no vetor pRM482, previamente digerido com a enzima *EcoRV* (Anexo 1.6).

O vetor pTHT (CONWAY; PROUDFOOT; ET AL., 2002) possui um gene de resistência a higromicina flanqueado por regiões intergênicas de  $\alpha\beta$ -tubulina, o que permite a substituição de uma  $\alpha$ -tubulina pelo vetor.

### **2.5.1. Ligação dos fragmentos de DNA**

Nas clonagens de DNA em vetor pGEM®-T Easy, uma alíquota (3  $\mu$ l) dos produtos de PCR foi utilizada diretamente em reações contendo vetor, T4 DNA Ligase e 1X do tampão *Rapid Ligation Buffer*. As reações de clonagem ocorreram a 4°C, por 16 horas. Todos os reagentes foram fornecidos pelo fabricante (Promega).

Nas clonagens de DNA em vetor pSC-B-amp, uma alíquota (2 µl) dos produtos de PCR diluído (1:10) foi utilizada diretamente em reações contendo tampão *StrataClone Blunt Cloning Buffer* e o vetor *StrataClone Blunt Vector Mix amp*. As reações de clonagem ocorreram à temperatura ambiente por 5 minutos. Todos os reagentes foram fornecidos pelo fabricante (Agilent Technologies).

Após a digestão com as enzimas de restrição apropriadas e a purificação em gel de agarose 1%, os fragmentos de DNA foram clonados nos vetores pET21a (Novagen), pROCK (DAROCHA; SILVA; ET AL., 2004), pGEM-Rad51Hig e pRM482 (CONWAY; PROUDFOOT; ET AL., 2002). A reação de ligação foi realizada a 16°C por 16 horas com 100 ng de DNA de vetor na presença de 1 unidade de T4 DNA ligase (Invitrogen ou NEB) e do tampão indicado pelo fabricante. A quantidade de DNA de inserto a ser usada na reação de ligação foi calculada através da fórmula:

$$\text{ng de inserto} = (\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto em Kb}) / (\text{tamanho do vetor em Kb}) \times \text{razão inserto:vetor}$$

A razão inserto/vetor utilizada foi 3:1.

### **2.5.2. Transformação**

As células eletrocompetentes *E. coli* DH5α (genótipo: *supE44*, *lacU169*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*) (HANAHAN; MESELSON, 1983) ou BL21(DE3)pLysS (genótipo: F<sup>-</sup> *ompT* *hsdSB* (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR)) (STUDIER; MOFFATT, 1986) foram preparadas de acordo com Sambrook *et al* (1989). Para a transformação, alíquotas de 40 µl (10<sup>6</sup>/10<sup>7</sup> células) da *E. coli* eletrocompetente foram descongeladas no gelo, acrescidas de

3 µl da reação de ligação e incubadas no gelo por 5 min. Cada amostra foi transferida para uma cubeta e submetida à eletroporação com um pulso elétrico de 2,5kV (eletroporador MicroPulser Bio Rad). Imediatamente após a eletroporação, a amostra foi transferida para um tubo de microensaio contendo 200 µl de meio 2xYT pH 7,0 (bacto-triptona 1,6%, extrato de levedura 1,0%, NaCl 0,5%) e incubada a 37°C sob agitação constante por 45 min. Diferentes volumes da reação foram plaqueados em meio 2xYT adicionado de 1,5% de ágar e 100 µg.ml<sup>-1</sup> de ampicilina e incubadas por 16 horas em estufa à 37°C.

Células quimiocompetentes XL1-Blue MRF [ $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$  [F' proAB lac<sup>+</sup>ZAM15]; Stratagene] também foram utilizadas e cultivadas em *Luria broth* (LB; 5 g extrato de levedura (Melford), 10 g triptona (Formedium), 5 g NaCl em 1 L pH 7.0] e ágar (Melford), se placas fossem necessárias. As ligações foram transformadas através de choque térmico a 42°C por 45 segundos seguido de incubação em gelo com a quantidade necessária de DNA. Uma alíquota de 900 µl de LB foi adicionado às células e essas foram incubadas por 50 min a 37°C com agitação. Aproximadamente 200 µl de células foram plaqueadas em placas seletivas de LB ágar, contendo 40 µg.ml<sup>-1</sup> de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase (X-gal; Sigma) e 100 µg.ml<sup>-1</sup> de ampicilina (Sigma). As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C. A presença de X-gal permitiu o rastreamento de colônias brancas e azuis. Algumas colônias brancas foram analisadas por PCR de colônia e digestão por enzima de restrição e as positivas foram sequenciadas pela *University of Dundee DNA sequencing service*.

### **2.5.3. Extração Plasmidial**

As colônias contendo inserto do tamanho de interesse foram crescidas por 16 h a 37°C em 3 ml (ou 200 ml para maxiprep) de meio 2xYT contendo 100 µg.µl<sup>-1</sup> do antibiótico ampicilina. A extração dos plasmídeos para posterior utilização foi realizada após esse período de incubação das bactérias através da utilização dos kits QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) ou a mesma versão para Maxipreps (Promega), seguindo orientações do fabricante.

### **2.6. Sequenciamento de DNA**

O sequenciamento de produtos amplificados por PCR ou plasmídeos foi realizado através do serviço de sequenciamento da University of Dundee ([www.dnaseq.co.uk](http://www.dnaseq.co.uk)) ou de acordo com o método descrito por Sanger (SANGER ET AL., 1977), através do sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). No último caso, em cada reação foram utilizados 4 µl do kit DYEnamic ET Dye Terminator MegaBACE (GE Healthcare), 5 pmol de iniciador específico e quantidades variáveis de DNA molde. O programa de amplificação, realizado no termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf), consistiu em 35 ciclos de desnaturação (95 °C, 20 seg), anelamento (55 °C, 15 seg) e extensão (60 °C, 80 seg). Após a amplificação, os produtos fluorescentes foram precipitados com etanol (Sambrook, 1989) e injetados no sequenciador, de acordo com as especificações do fabricante.

Os resultados obtidos pelo sequenciamento de DNA foram analisados através do programa Phred, do pacote Phred-Phrap (EWING ET AL., 1998), disponibilizado em <http://helix.biomol.unb.br/phph>. Sequências gênicas e protéicas foram alinhadas através do programa Multalin (CORPET, 1988) em

<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>. A sequência de Rad51 de *T. brucei* e *T. cruzi* foi obtida através do banco de dados GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)).

### **3. 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 5x10<sup>7</sup> parasitos por 50µl. Igual volume de agarose de baixo ponto de fusão 1%, a 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 5x10<sup>7</sup>.

Após solidificação, cerca de 20 min a 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<sup>-1</sup>), 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 (ou PFGE do inglês *Pulse Field Gel Electrophoresis*) conforme descrito por (REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006).

Os blocos contendo moléculas de DNA dos parasitos foram submetidos ao PFGE ao lado de um padrão comercial de peso molecular (cromossomos de *S. 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 (REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006).

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 (REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006).

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.

### **3.1. Transferência de *Southern blot***

Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma solução de depuração (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 à radiação ultravioleta em um aparelho UV Crosslinker Fisher Biotech, enxaguadas brevemente em solução

SSC 2x, secas a 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*.

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

O RNA total das culturas de *T. cruzi* 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 ( $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ ). 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, 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 ( $50 \text{ µg.ml}^{-1}$ ) 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.

#### **4.1. Hibridação e marcação da sonda.**

Os fragmentos dos genes Rad51 e de tubulina foram marcados 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  $\alpha$  com o isótopo  $P^{32}$  ( $\alpha$ - $^{32}P$  [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  $\mu$ l. 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 ( $NaH_2PO_4$  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.

## **5. Manipulação de proteínas**

### **5.1. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* BL21**

#### **5.1.1. Expressão em pequena escala**

O vetor pET21a possui uma sequência N-terminal de T7 e uma cauda de histidina na porção C-terminal. Esse vetor é utilizado na clonagem de genes de interesse em fusão com histidina que possibilita posteriormente a purificação dessa proteína através de colunas de níquel (Anexo 1.7).

Colônias isoladas de *E. coli* BL21pLYS S, previamente transformadas com o plasmídeo de interesse e plaqueadas em meio 2xYT sólido, foram inoculadas em 3 ml de meio 2xYT líquido contendo 100 µg.ml<sup>-1</sup> de ampicilina e 34 µg.ml<sup>-1</sup> de clorafenicol e incubadas por 16 h a 37°C sob agitação constante. Esse pré-inóculo foi então diluído 1:50 em 10 ml de meio 2xYT suplementado com ampicilina e clorafenicol e incubado a 37°C até atingirem

aproximadamente a OD<sub>600</sub> 0,6. Em seguida, foi retirado 1 ml da cultura (controle não induzido) e Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado ao restante na concentração final de 1 mM para indução da expressão. A partir desse ponto, amostras foram coletadas em diferentes intervalos de incubação a 30°C e agitação constante. A fim de garantir que quantidades iguais de proteína total estavam sendo analisadas, a OD<sub>600</sub> foi sempre determinada, de forma que a mesma quantidade de células fosse coletada em cada tempo.

As amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas por 10 min a 15000 x *g*, o sedimento de bactérias obtido foi solubilizado em 35 µl de tampão de amostra de SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,00125%), homogeneizado e fervido por 5 min. Após a lise das células e centrifugação por 1 min a 15000 x *g*, 10 µl foram retirados do sobrenadante e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue (Coomassie blue R250 0,25%, metanol 50%, ácido acético 10%). A corrida do gel foi realizada a 200 V em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%) por aproximadamente 1 h. A confirmação do peso molecular das proteínas expressas foi realizada por comparação com um padrão de proteínas de peso molecular conhecido (Biorad, High Range).

### **5.1.2. Teste de solubilidade da proteína**

Após 4 horas de indução com IPTG, 1,5 ml de cultura foram separados e centrifugados por 15 min (4000 x *g*, 4°C). O sedimento obtido foi solubilizado em 1 ml de tampão de ligação da coluna (20 mM fosfato de sódio, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4) contendo 2,5 mg.ml<sup>-1</sup> de lisozima. As células foram

submetidas a três ciclos de choque térmico 37°C/-80°C e foram sonicadas em amplitude de 30% por 45 segundo em gelo (15s ON e 5s OFF) para rompimento das mesmas e liberação das proteínas citoplasmáticas. Para representar a expressão total de proteína após 4 h de indução, uma alíquota de 100 µl foi retirada e acrescida de tampão de amostra de SDS-PAGE (concentração final 1 X). O restante foi então centrifugado (9000 x *g*, 30 min), o sobrenadante separado e o sedimento obtido diluído em tampão da coluna. Tampão de amostra de SDS-PAGE (concentração final 1 X) foi adicionado ao sobrenadante (fração contendo proteína solúvel) e ao sedimento (proteína insolúvel) e ambos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%.

### **5.1.3. Expressão em larga escala e purificação da proteína TcRad51 de *T. cruzi***

O mesmo protocolo descrito para expressão em pequena escala foi seguido, porém a colônia de *E. coli* BL21 pLYS S isolada foi inoculada em 5 ml de meio 2xYT e esse pré-inóculo foi diluído em 200 mL de meio 2xYT. As células foram mantidas sob agitação constante após indução com IPTG 1 mM por 4 h a 30°C. O sedimento de bactérias obtido após centrifugação foi solubilizado em 10 ml de tampão de ligação da coluna (20 mM fosfato de sódio, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4) contendo lisozima na concentração final de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. O ressuspendido foi congelado a - 80°C *overnight*. Posteriormente, as células foram submetidas a três ciclos de choque térmico 37°C/-80°C e foram sonicadas em amplitude de 30% por 45 seg em gelo (15s ON e 5s OFF). Esse produto foi então centrifugado a 9000g 30 min a 4°C. A confirmação da expressão e solubilidade da proteína foi realizada através de SDS-Page 10%. A proteína na fração solúvel foi então purificada em

coluna de níquel HisTrap (GE) através do sistema de cromatografia AKTADesign (GE) utilizando solução de eluição contendo 20 mM fosfato de sódio, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.4, seguindo instruções do fabricante. Algumas frações obtidas na purificação foram resolvidas em gel de SDS-PAGE 10% e as proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

## **5.2. Produção de anticorpos**

Anticorpos específicos foram obtidos através da imunização de camundongos com a proteína de interesse, expressa com uma cauda de histidina. Três camundongos fêmeas C57Bl6 com 7 semanas de vida foram imunizados com 30 µg de proteína purificada na região subcutânea. A segunda, a terceira e a quarta imunização foram realizadas 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Quinze dias após a última imunização, foi retirada uma amostra de sangue do plexo retroorbital para verificar a presença de anticorpos específicos. Essa amostra foi conservada a 4°C por 16 horas e posteriormente centrifugada por 5 min a 5000 rpm. O soro foi, então, coletado e guardado a -20°C. Uma amostra de sangue também foi retirada de um camundongo não imunizado da mesma linhagem dos demais para ser usado como controle negativo do soro imunizado.

## **5.3. Western blot**

Epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento foram utilizadas para o preparo de extrato protéico para *western blot*, aproximadamente  $1 \times 10^8$  células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Formas sanguíneas de *T. brucei*,

aproximadamente  $1 \times 10^8$  células na fase logarítmica de crescimento, foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes em PBS, ressuspendido em um volume de tampão de SDS-PAGE (concentração final 1 X) e um volume de água deionizada para a concentração de 2 a  $5 \times 10^8$  células.ml<sup>-1</sup>. A amostra foi então submetida à lise mecânica por passagem em seringa e posteriormente fervida por 10 min. Cerca de 10 µg de proteína total foram separadas em gel de poliacrilamida 10% contendo 0.1% de SDS, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo primário (anti-TcRad51, diluído 1:2000, anti-alfa tubulina monoclonal, Abcam, diluído 1:12000, anti-TbRad51 policlonal purificado, Pacific Immunology, diluído 1:200 ou anti-OPB (oligopeptidase B) policlonal, diluído 1:2000 (gentilmente cedido por Jeremy Mottram) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-camundongo IgG (GE), 1:10.000 ou 1:12.000, anti-coelho IgG, Amersham Biosciences, 1:2000 ou anti-ovelha IgG, Sigma, 1:12000). As proteínas foram detectadas utilizando o reagente ECL-Plus Western Blot Detection System (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante e a imagem detectada em filme KODAK ou em aparelho STORM (Amersham Bioscience).

#### **5.4. Imunolocalização de TcRad51**

A localização de TcRad51 nativa em epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas (gentilmente cedidas pelo laboratório do prof. Sérgio Schenkman) de *T. cruzi* foi realizada através de imunolocalização com anticorpo anti-TcRad51. Os parasitos foram sedimentados por centrifugação e concentrados para  $5 \times 10^6$  parasitos.ml<sup>-1</sup> em PBS. Dez microlitros da suspensão celular foram aplicados em lâmina e tratada com solução de PBS suplementada com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos a temperatura ambiente. As

lâminas foram lavadas três vezes com PBS, e as células foram incubadas com PBS + Triton X-100 0,1% por 5 minutos, lavadas novamente, e bloqueadas com PBS + BSA 1% por 30 minutos. Anticorpos policlonais primários anti-TcRad51 isolados em camundongos foram diluídos na proporção 1:2000 em PBS + 0,1% de BSA e aplicados na lâmina por 16 horas. No dia seguinte a lâmina foi lavada e incubada com DAPI na concentração de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 555 (Invitrogen) durante 30 minutos. Após uma última lavagem com PBS, as lâminas foram seladas e as imagens capturadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon E600 equipado com uma câmera DXM 1200 F. As imagens foram analisadas através do Programa Photoshop. Para quantificação da intensidade das fluorescências foi utilizado o programa ImageJ e cerca de 30 parasitos foram analisados para cada ponto. Análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad.

## **6. Cultura e transfecção de *T. cruzi***

Epimastigotas do clone CL Brener, provenientes do laboratório do Prof. Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptone - liver digest neutralized* 5g.L<sup>-1</sup>, NaCl 4g.L<sup>-1</sup>, bactotriptose 5g.L<sup>-1</sup>, KCl 0,4g.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8g.L<sup>-1</sup>, dextrose 2g.L<sup>-1</sup>, hemin 0,2% 10ml em NaOH 0,05M, pH 7,3) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e os antibióticos penicilina (100U.ml<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (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, enxaguados 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) e 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<sup>-1</sup> como descrito por DaRocha e colaboradores (2004). Em uma alíquota de 0,4 ml dessa suspensão de células foram adicionados 50 µl de plasmídeo (1 µg.µl<sup>-1</sup>) 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 2 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 (CAMARGO, 1964). Dois dias após a eletroporação, 200 µg.ml<sup>-1</sup> 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 streptomina, além da higromicina a uma concentração final de 200 µg.ml<sup>-1</sup>. Após a seleção, a cultura transfectada permaneceu sendo mantida na presença de higromicina.



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

Para obtenção de clones da cultura de parasitos transfectados, essas células foram plaqueadas em placas de ágar sangue (GOMES ET AL., 1991). Essas placas são feitas utilizando 0,75% de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) 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 – higromicina 200 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) 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 solidificará após o contato com gelo. As placas devem ficar por dois dias a 37°C, antes de serem utilizadas.

As placas utilizadas continham o antibiótico higromicina. Os parasitos foram plaqueados em um volume de 100 $\mu$ l em diferentes placas e cada uma contendo 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> 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.

### **7. Cultura e transfecção de *T. brucei***

Formas sanguíneas da cepa 427 (CROSS, 1975) na fase logarítmica de crescimento (densidade de aproximadamente 2.5 x 10<sup>6</sup> células.ml<sup>-1</sup>) foram cultivadas em meio HMI-9 (HIRUMI; HIRUMI, 1994). Esse meio comercializado pela Invitrogen contém hipoxantina, L-cisteína, ácido pirúvico, timidina, ácido

batocuproedisulfônico e  $\beta$ -mercaptoetanol. O meio completo foi feito pela adição de 10% soro fetal bovino e 1 % penicilina/estreptomicina (Invitrogen) ao meio HMI-9. As células foram repicadas de duas a três vezes por semana e crescidas em estufa a 37°C com 5 % CO<sub>2</sub>.

### **7.1. Transformação de formas sanguíneas de *T. brucei* e seleção das células transformadas**

A transformação de formas sanguíneas de *T. brucei* foi realizada por eletroporação com 5  $\mu$ g dos seguintes vetores linearizados: vetores para o nocaute de TbRad51 contendo gene de resistência a blasticidina ou puromicina (MCCULLOCH; BARRY, 1999), pRM482 (Proudfoot & McCulloch, 2005) contendo o gene de interesse (TcRad51 ou TbRad51) ou o vetor pTHT (CONWAY; PROUDFOOT; ET AL., 2002). Após a digestão, esses vetores foram precipitados com etanol e quantificados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Células na fase logarítmica de crescimento ( $5 \times 10^7$  células) foram diluídas em 0.5 ml de meio Zimmerman (NaCl 132 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, acetato de magnésio 0.5 mM, acetato de cálcio 0.09 mM [pH7]) suplementado com 1% de glicose (ZMG). Todas as eletroporações foram executadas no *Gene Pulser II* (Bio-Rad) a 1.5 kV e 25 mF de capacitância. As células foram então diluídas em 10 ml de meio HMI-9 e incubadas a 37°C por 12 a 24 h para que se recuperassem do choque elétrico.

Para a seleção dos transformantes, o número de células na cultura foi determinado por contagem em câmara citométrica de Neubauer e a cultura foi centrifugada por 10 min a 1620 x *g* à temperatura ambiente. O sedimento obtido foi ressuspensionado em meio HMI-9, contendo o antibiótico desejado (0,5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de puromicina, 2,5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de blasticidina e/ou 1,3  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de

Neomicina), para a concentração de aproximadamente  $1,4 \times 10^5$  células.ml<sup>-1</sup> de meio. As células foram distribuídas em placas de 24 poços ( $2,1 \times 10^5$  células/poço) e incubadas a 37°C por uma semana a dez dias, tempo suficiente para que as células não resistentes morressem na presença do antibiótico e as células resistentes fossem detectadas. Após a contagem do número de poços contendo os transformantes, a população de transformantes no poço foi considerada clonal, se o número de poços com células em crescimento não excedeu 10 em 24 poços.

Quando os clones foram confirmados, cada linhagem celular foi congelada em nitrogênio líquido. Estoques foram preparados a partir de formas sanguíneas na fase logarítmica de crescimento (densidade de aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>). Aliquotas de 1 ml de cultura foram preparadas adicionando-se glicerol (concentração final 10%). As células foram congeladas a -80°C por 48 h e transferidas para o tanque de nitrogênio líquido, onde foram estocadas. Quando necessário, as células foram recuperadas por descongelamento rápido a 37°C e diluídas em 10 ml de meio HMI-9.

## **8. Sensibilidade ao dano em DNA**

### **8.1. Ensaio em *T. cruzi***

Epimastigotas da cultura selvagem, superexpressora e heminocaute de 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<sup>-1</sup>. Foram realizados no mínimo dois experimentos para cada ensaio e foi escolhida uma curva representativa. As densidades das culturas

foram determinadas utilizando a eritrosina como corante vital. Para as curvas de sobrevivência, a concentração de células das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das respectivas culturas não tratadas crescidas sob as mesmas condições. Para as curvas de crescimento, a concentração de células das culturas não tratadas e tratadas foi determinada e plotada em função do tempo.

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 ou 640  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de zeocina (Invitrogen). Controles foram realizados na ausência de zeocina (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após quatro dias de exposição a esse antibiótico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em um gráfico de barras com desvio padrão.

Para o ensaio com radiação gama, os parasitos foram distribuídos em alíquotas de 5 ml em garrafas de cultura. Essas culturas foram submetidas à dose de 200, 500 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  $\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ . Controles foram realizados na ausência de radiação gama. 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 média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de crescimento com desvio padrão.

Para a curva de resposta ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os parasitos foram distribuídos em alíquotas de 1 ml em placas contendo 24 poços e mantidos em câmara úmida. As culturas foram expostas a doses de 150, 200 e 250  $\mu g.ml^{-1}$  de peróxido de hidrogênio (Merck). Controles foram realizados na ausência de  $H_2O_2$  (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após três dias de exposição a esse agente genotóxico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

Para a curva de resposta à luz ultravioleta, os parasitos foram distribuídos em alíquotas de 2 ml em placas contendo 6 poços e mantidos em câmara úmida. As culturas foram expostas a doses de 5000 e 10000  $J.m^{-2}$  de luz UVC. Controles foram realizados na ausência de luz UV (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após três dias do tratamento, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

Para a curva de resposta à cisplatina, os parasitos foram distribuídos em alíquotas de 1 ml em placas contendo 24 poços e mantidos em câmara úmida. As culturas foram expostas a doses de 25, 50 e 75  $\mu g.ml^{-1}$  de cisplatina. Controles foram realizados na ausência de cisplatina (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após três dias de exposição a esse agente genotóxico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

## **8.2. Ensaio em *T. brucei***

### **8.2.1. Curva de crescimento e sobrevivência a agentes genotóxicos**

Formas sanguíneas de *T. brucei*, durante a fase logarítmica de crescimento, foram diluídas para a concentração de  $5 \times 10^4$  células.ml<sup>-1</sup> de meio de cultura para a realização de curvas de crescimento e de sobrevivência com agentes genotóxicos. As células foram subsequentemente aliqüotadas em triplicatas de 1 ml e incubadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A concentração das células foi medida em diferentes intervalos de tempo por contagem em câmara citométrica de Neubauer. Para as curvas de sobrevivência, a concentração de células das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das respectivas culturas não tratadas crescidas sob as mesmas condições. Para as curvas de crescimento, a concentração de células das culturas não tratadas e tratadas foi determinada e plotada em função do tempo.

Para analisar a sensibilidade a peróxido de hidrogênio, células foram submetidas às seguintes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50, 100 e 150 µM. Controles foram realizados na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após três dias de exposição a esse agente genotóxico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

Para analisar a sensibilidade a fleomicina, também antibiótico da família bleomicina, células foram submetidas a 0,04 µg.ml<sup>-1</sup> de fleomicina em triplicata. Controles foram realizados na ausência de fleomicina para verificar alterações na curva de crescimento. As amostras foram incubadas a 37°C e o

número de células viáveis foi determinado após diferentes intervalos de tempo através da contagem de células. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de crescimento com desvio padrão.

Para analisar a sensibilidade a cisplatina, células foram submetidas às seguintes concentrações de cisplatina: 1,7, 3,3 e 5,0  $\mu\text{M}$  em triplicata. Controles foram realizados na ausência de cisplatina (100% de sobrevivência). Esse ensaio foi realizado em triplicata e após três dias de exposição a esse agente genotóxico, os parasitos foram contados utilizando câmara citométrica. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de sobrevivência com desvio padrão.

Para analisar a sensibilidade ao MMS, células foram submetidas à 0.0001 % de MMS em triplicata. Controles foram realizados na ausência de MMS (100% de sobrevivência). As amostras foram incubadas a 37°C e o número de células viáveis foi determinado após diferentes intervalos de tempo através da contagem de células. A média dos valores obtidos foram plotados em uma curva de crescimento com desvio padrão.

### **8.2.2. Análise de valores de IC50 por Alamar blue para MMS e fleomicina**

As linhagens celulares foram crescidas até a fase logarítmica, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>, e as células foram contadas usando câmara citométrica. Primeiro, a placa de 96 poços (Nunclon) foi preparada com 100  $\mu\text{l}$  do meio HMI-9 que foi adicionado em todos os poços, exceto para a primeira coluna. Para a primeira coluna, 200  $\mu\text{l}$  de estoque de MMS e fleomicina foram adicionados (0,01% e 4  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivamente). Foram feitas diluições seriadas: 100  $\mu\text{l}$  da primeira coluna foram misturados com a

próxima coluna. Com ponteiros limpas, 100 µl da segunda coluna foi adicionada à terceira coluna e homogeneizada, e assim por diante. Para cada poço, 100 µl de células com uma densidade de  $2 \times 10^5$  células por ml foram adicionados. Essas células foram incubadas por 48 horas e posteriormente 20 µl de resazurina 0,125% em PBS (Sigma) foi adicionado. A placa foi então incubada por 24 horas a 37°C. Após esse período, a placa foi lida por um espectrômetro utilizando filtro de 540 nm de excitação e 590 nm de emissão (Wallac Envision, 2102 leitor Multi-label) e os dados foram analisados usando o MS Excel e GraphPrism.

### **9. Ensaio de eficiência de recombinação através de transfecção**

Para analisar a taxa de recombinação, um fragmento linearizado de DNA contendo gene de resistência ao antibiótico higromicina foi transfectado em cada linhagem celular. Esta construção continha um cassete de resistência a higromicina flanqueado com regiões intergênicas de tubulina. As linhagens de células foram cultivadas em fase logarítmica, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por ml, num volume final de 25 ml. A densidade celular foi avaliada através da contagem em câmara citométrica. Um total de  $5 \times 10^7$  células foram transfectadas com DNA linearizado (5 µg). As células foram então incubadas para recuperar da transfecção por três gerações antes do plaqueamento seletivo em meio HMI-9 contendo  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de higromicina. Um total de  $5 \times 10^6$  células foram diluídas em 36 ml de meio seletivo. Em seguida, 1,5 ml de células diluídas foram distribuídas em cada poço da placa de 24 poços, o que equivale a  $2,08 \times 10^5$  células por poço. Como as células homozigotas mutantes tinham maior probabilidade de ter uma deficiência na capacidade de recombinação,  $2 \times 10^7$  células foram distribuídas em 48 poços, o que equivale a  $4,16 \times 10^5$  células por poço. As células foram incubadas por 14 dias a 37 °C



e o número de poços com o crescimento celular foi marcado. Cada linhagem celular foi analisada em triplicata com o mesmo DNA linearizado. A eficiência de transformação foi descrito como o número de poços com crescimento por  $10^6$  células em meio seletivo.

## Resultados

Vários estudos demonstraram o papel da recombinação homóloga na recuperação de diferentes lesões no DNA, principalmente de quebras de fita dupla (SYMINGTON, 2002). Como Rad51 é considerada a proteína chave deste mecanismo, diferentes estratégias foram adotadas como a geração de linhagens superexpressoras e heminocautes do gene TcRad51 com o objetivo de investigar HR em *T. cruzi*. A expressão e purificação da proteína TcRad51 foram realizadas para geração de anticorpos anti-TcRad51, importantes para avaliação dos níveis protéicos e da localização de TcRad51 após o tratamento com radiação gama. Além disso, a comparação de TcRad51 com TbRad51 em *T. brucei* foi verificada para melhor compreender o papel de Rad51 no reparo de DNA nesses organismos.

### 1. Geração de linhagens de *T. cruzi* superexpressando TcRad51

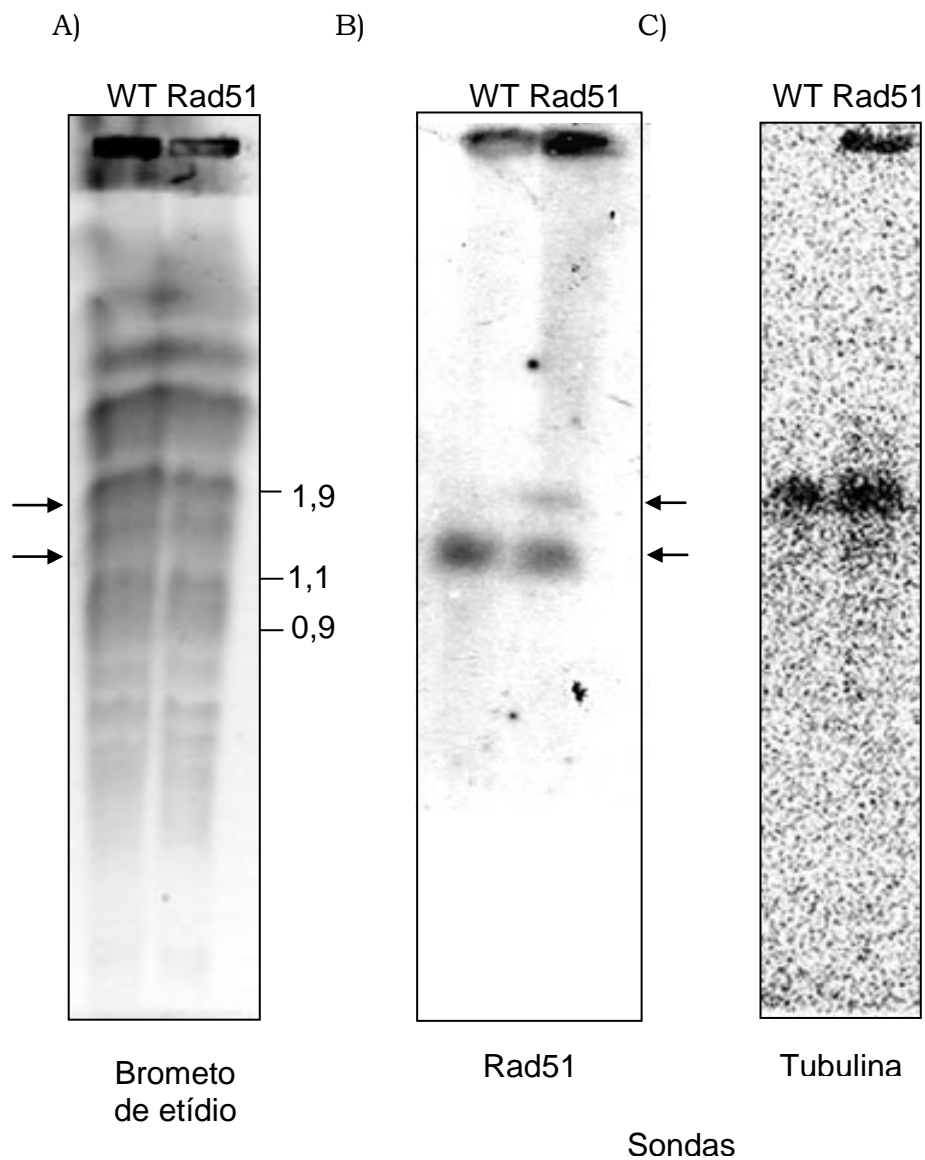
A superexpressão de Rad51 vem sendo objeto de estudo em diversos organismos e tipos celulares com o objetivo de investigar o papel dos níveis de expressão de Rad51 na regulação da HR (KLEIN, 2008; SCHILD; WIESE, 2010). Neste trabalho a superexpressão de Rad51 foi realizada em *T. cruzi* com o objetivo de aprofundar o conhecimento da HR nesse organismo. Para a geração de linhagens superexpressando TcRad51 em *T. cruzi*, foi utilizado o vetor pROCK (DAROCHA; SILVA; ET AL., 2004) contendo o gene TcRad51.

Os plasmídeos linearizados foram utilizados para transfecção por eletroporação de culturas epimastigotas de *T. cruzi* do clone 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  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Após um mês de seleção, nenhum parasito 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.

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

Para verificar se ocorreu a correta integração do TcRad51 exógeno no genoma dos parasitos transfectados, foi realizado um PFGE seguido de *Southern blot* com o DNA extraído a partir das culturas selvagem e transfectada com o vetor contendo TcRad51. O gel obtido foi corado com brometo de etídio para a visualização de bandas cromossômicas, sendo estas, posteriormente, transferidas para uma membrana e hibridadas com sondas de TcRad51 e de tubulina (Figura 8). Verificou-se a presença de uma banda correspondente ao TcRad51 endógeno em ambas as culturas cujo tamanho é de aproximadamente 1,2 Mb (figura 8B) como também mostrado no trabalho de Freitas (2003). Na cultura transfectada, observou-se uma segunda banda correspondente ao TcRad51 exógeno, indicando a integração desse fragmento no genoma do parasito em uma banda cromossômica de aproximadamente 1,8 Mb correspondente à banda cromossômica que contém o *cluster* dos genes de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina (Figura 8C).



**Figura 8: PFGE e Southern blot de DNA extraído de *T. cruzi* selvagem (WT) e transfetado com TcRad51 (Rad51).** A) PFGE de DNA corado com brometo de etídio mostrando as bandas cromossômicas das culturas selvagem e superexpressora de TcRad51. B e C) Southern blot das membranas correspondentes ao PFGE mostrado em A através da hibridação com sonda para TcRad51 (B) e tubulina (C). O padrão de peso molecular de *S. cerevisiae* (PM) está demonstrado à direita do gel com seus respectivos tamanhos em megabases. A seta superior mostra a posição dos genes TcRad51 exógeno e tubulina e a seta inferior mostra a posição do TcRad51 endógeno.

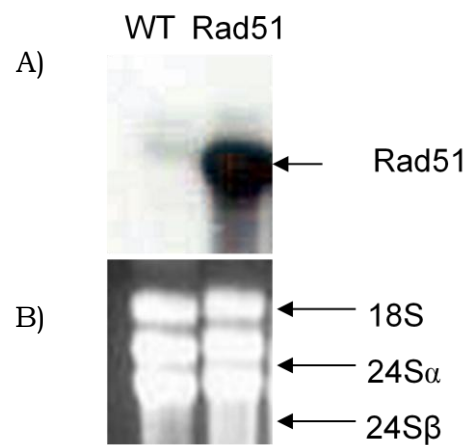
### **1.2. Análise do mRNA dos parasitos transfectados**

Para confirmar que o gene TcRad51 transfectado estava transcricionalmente ativo, o RNA foi extraído e analisado seguido da técnica de *northern blot*. As amostras de RNA dessas culturas foram separadas em gel de agarose desnaturante e transferido para membrana de náilon para posterior hibridação com sonda para TcRad51 (Figura 9). A análise da figura evidenciou uma banda de 1700 pb de tamanho correspondente ao mRNA de TcRad51. A cultura transfectada com TcRad51 apresenta níveis de expressão de TcRad51 maiores que a cultura selvagem.

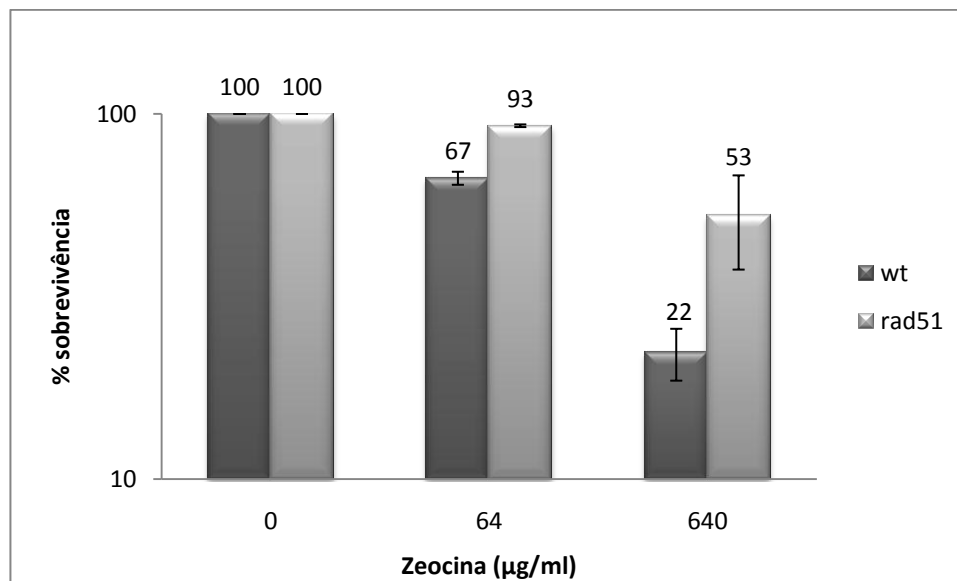
### **1.3. Avaliação do papel de TcRad51 no reparo de quebras duplas de DNA**

Com o objetivo de avaliar o papel de TcRad51 no reparo de quebras duplas de DNA em *T. cruzi*, as culturas superexpressoras de TcRad51 foram tratadas com agentes que causam essas lesões como a zeocina e radiação gama (KESZENMAN ET AL., 1992).

Para 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 10), 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 as 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 mais eficiente de quebras de fita dupla no DNA.



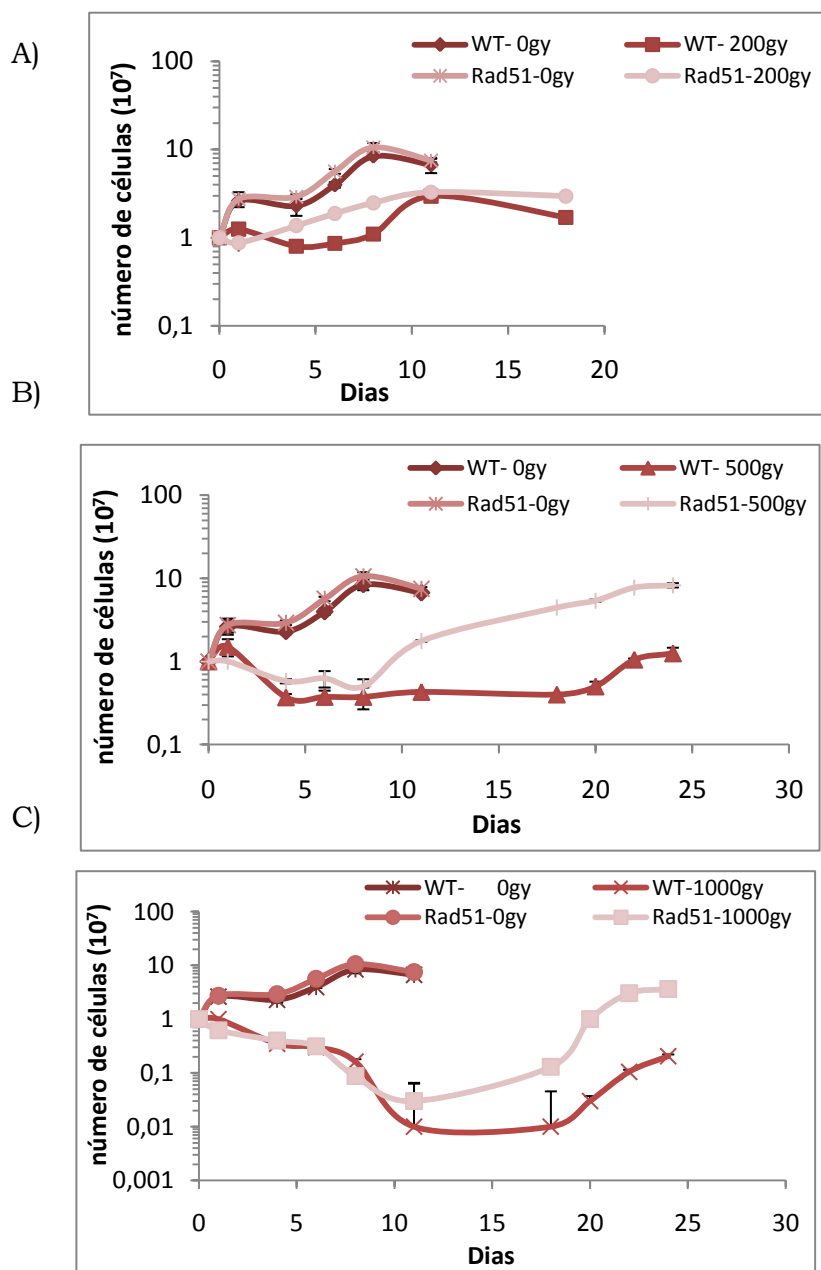
**Figura 9: Northern blot de parasitos selvagens e superexpressando TcRad51.** A) Hibridação com sonda de TcRad51 do RNA total das culturas selvagem (WT) e transfectada com TcRad51 (Rad51). A seta mostra a posição do mRNA de TcRad51. B) Gel de agarose corado com brometo de etídio contendo 15  $\mu$ g do RNA total extraído das culturas. As setas mostram as bandas de RNA ribossômico.



**Figura 10: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem (WT) e superexpressando TcRad51 (Rad51) submetidos ao tratamento com zeocina.** As células foram tratadas com zeocina nas doses de 64 e 640 µg/ml e foram contadas após o quarto dia na presença da droga juntamente com as células não tratadas. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas, e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

Como segunda estratégia para verificar o papel de TcRad51 no reparo de quebras de fita dupla de DNA, foram realizados ensaios com os parasitos superexpressores de TcRad51 utilizando radiação gama. Foram realizadas curvas de crescimento de células selvagens e superexpressando TcRad51 expostas à radiação gama nas doses de 200, 500 e 1000 Gy. Verificou-se que as culturas selvagem e transfectadas apresentam o mesmo perfil na curva de crescimento na ausência de irradiação, o que indica que a superexpressão do gene TcRad51 não altera o crescimento do parasito (Figura 11). Analisando as culturas expostas às doses de 500 Gy e 1000 Gy (Figura 11B e C), observa-se inicialmente que parasitos de ambas as culturas não se dividem durante um período inicial variável. Os parasitos superexpressores recuperam mais rapidamente o crescimento que os parasitos selvagens em todas as doses administradas (Figura 11). O período de recuperação até o início da fase de proliferação é proporcional à dose recebida, por exemplo, as culturas submetidas à 200 Gy, menor dose administrada, foram as primeiras a retomarem o crescimento (Figura 11A). Em conjunto, esses resultados sugerem que a superexpressão de TcRad51 possibilita uma cinética de recuperação mais rápida após o tratamento com radiação gama e, conseqüentemente, após exposição a agentes que causam quebras de fita dupla.





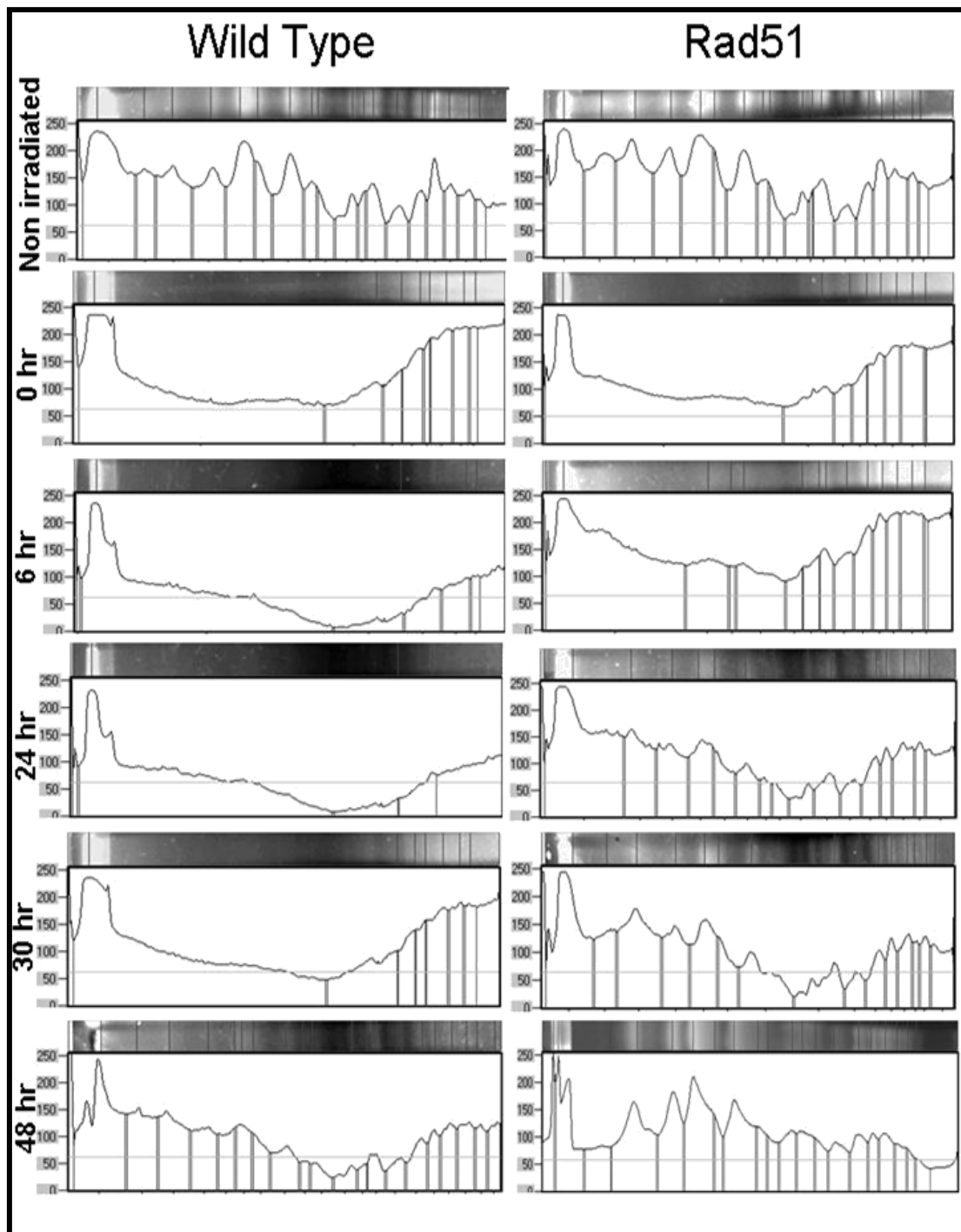
**Figura 11: Curva de crescimento de *T. cruzi* selvagem e superexpressando TcRad51 submetidos à radiação gama.**

Curvas de crescimento de *T. cruzi* selvagem (WT) e superexpressando TcRad51 (Rad51) na ausência de radiação (0gy) (A, B e C) e irradiados com 200 Gy (A), 500 Gy (B) e 1000 Gy (C). Esses parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de 10<sup>7</sup> epimastigotas/ml. Os valores mostrados correspondem à média de um experimento realizado em triplicata, e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

#### **1.4. 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 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 as culturas cultivadas por 6 horas após a irradiação foram analisadas, pode-se observar um surgimento discreto de bandas de alto peso molecular somente nas células superexpressoras (Figura 12 – 3º painel, coluna direita). Tal fenótipo se torna mais evidente quando as células cultivadas por 24 horas após a irradiação foram analisadas (Figura 12 – 4º painel, coluna



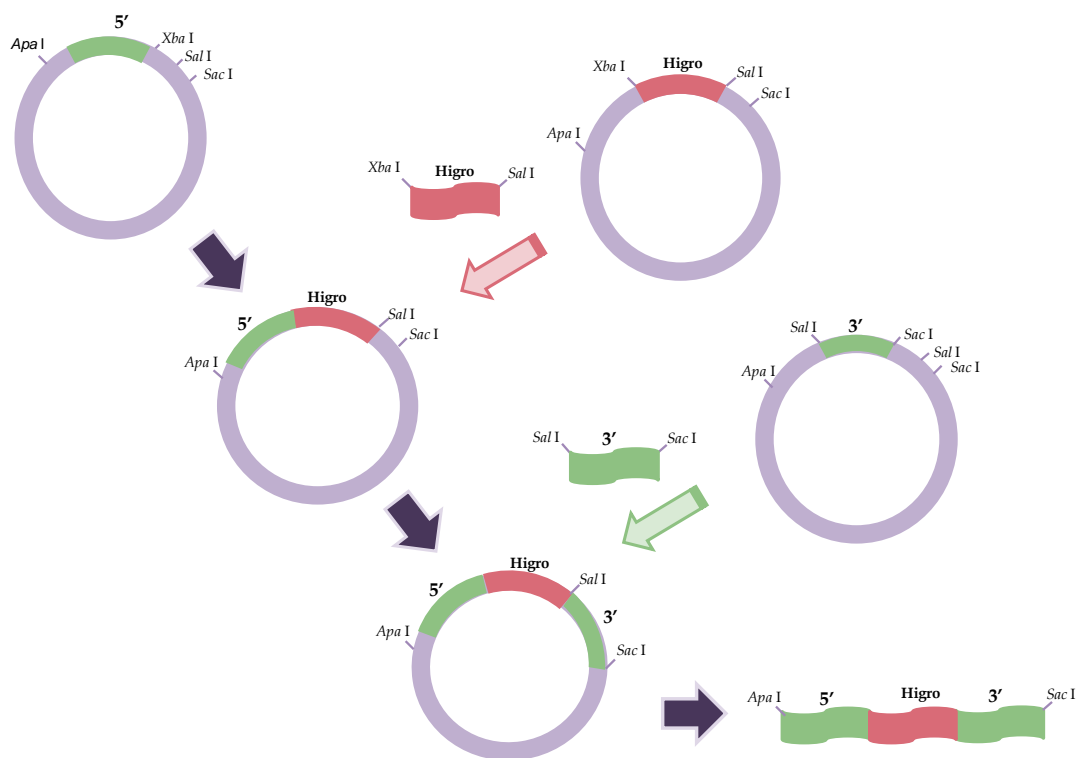
**Figura 12: PFGE do DNA dos parasitos selvagens e superexpressando TcRad51 submetidos à radiação gama.** A figura mostra PFGE na ausência de radiação (Non irradiated) e diferentes tempos (0, 6, 24, 30 e 48h) após a exposição a 500 Gy de radiação gama. Para cada canaleta do gel está mostrada a medida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

direita). 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.

## **2. Geração de linhagens *T. cruzi* heminocautes de TcRad51**

Com o intuito de aprofundar os estudos de TcRad51 e suas funções no reparo de DNA em *T. cruzi*, foram desenvolvidos vetores para a geração de linhagens heminocautes de TcRad51. Esse vetor possui gene de resistência ao antibiótico higromicina flanqueado por 500 pb correspondentes às regiões que flanqueiam a ORF de Rad51.

Cada amplicon obtido da amplificação do gene de resistência a higromicina como também das regiões que flanqueiam a ORF de Rad51 foi clonado separadamente no plasmídio pGEM T-easy (Promega) (Figura 13 e Anexo 1.1). O vetor utilizado para as clonagens posteriores foi o pGEM –T easy contendo um fragmento da montante (“*upstream*”) da ORF de Rad51 (5’). Inicialmente, o gene de resistência a higromicina foi digerido com *Xba* I e *Sal* I e foi clonado nesse vetor que também foi digerido com essas enzimas. Posteriormente, esse vetor contendo uma região homóloga à montante da ORF de TcRad51 e gene de resistência a higromicina foi digerido com as enzimas *Sal* I e *Sac* I. A mesma digestão foi realizada para o vetor contendo a região jusante (“*downstream*”) da ORF de TcRad51 (3’) e o fragmento liberado correspondente a essa região foi purificado e ligado com o vetor descrito anteriormente. Cerca de 150 µg desses plasmídeos foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *Apa* I e *Sac* I para posterior transfecção dos parasitos.

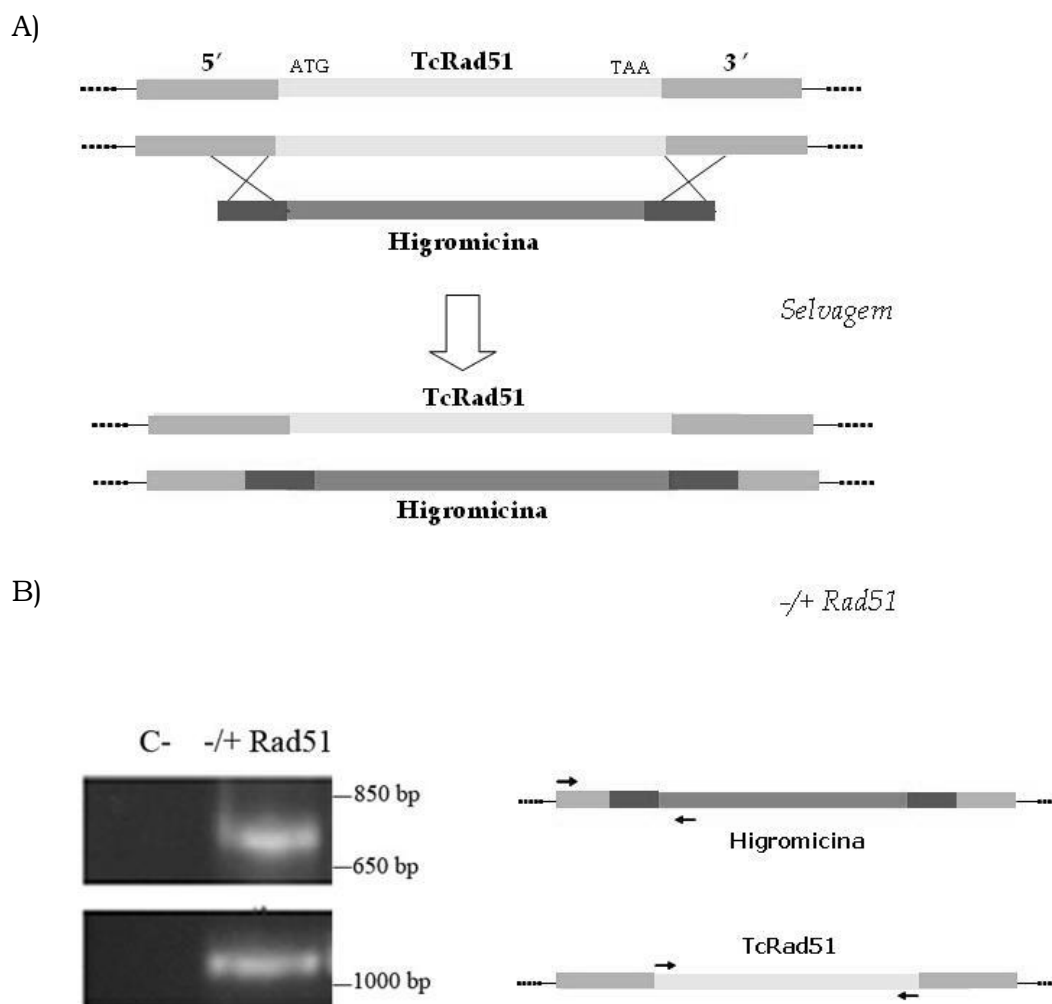


**Figura 13: Montagem dos vetores para deleção do gene de TcRad51.** As regiões 5' e 3' do alelo de TcRad51 como também o gene de resistência a higromicina foram clonados separadamente em pGEM T-easy. O vetor utilizado para as clonagens posteriores foi o pGEM -T easy contendo o fragmento da região 5'. Inicialmente, esse vetor e os genes de resistência a higromicina foram digeridos com *Xba I* e *Sal I* e foram ligados. Após a seleção de clones positivos, esse vetor contendo a região 5' de TcRad51 e gene de resistência a higromicina foi digerido com as enzimas *Sal I* e *Sac I*. A mesma digestão foi realizada para o vetor contendo 3' e o fragmento liberado correspondente a essa região foi purificado e ligado com o vetor descrito anteriormente. Após a montagem desse vetor, foi realizado digestões com *Apa I* e *Sac I* para posterior transfecção.

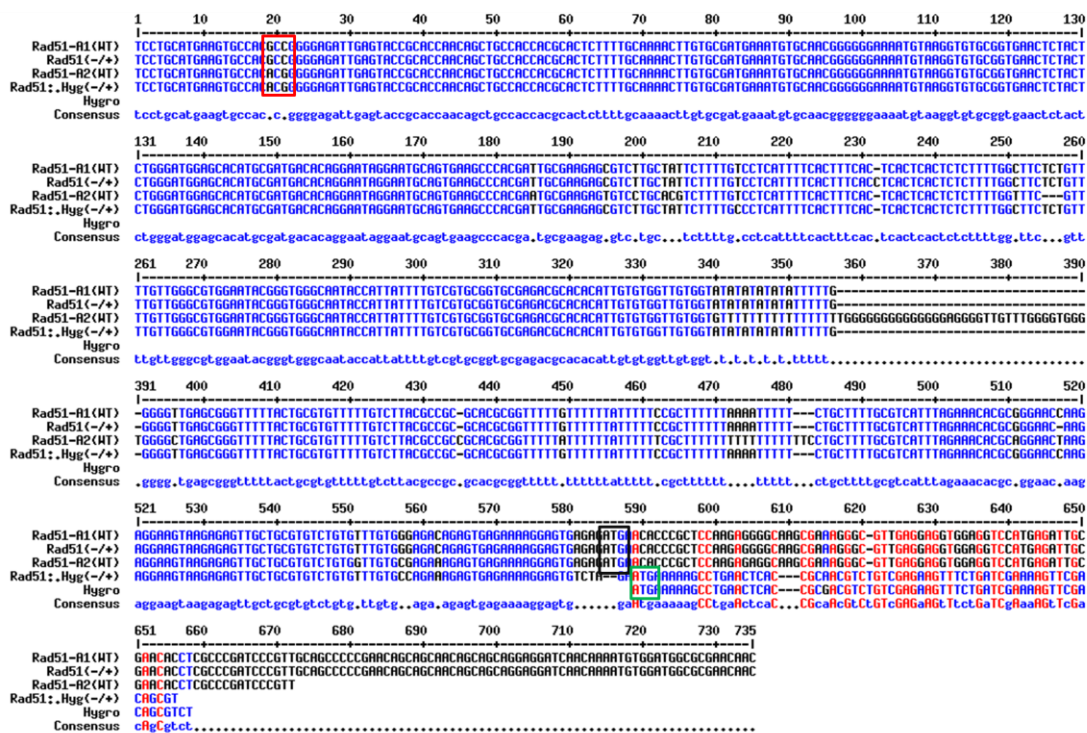
Parasitos do clone CL Brener foram transfectados com esse vetor linearizado e selecionados com o antibiótico higromicina. Após a seleção, clones foram isolados através de placas de ágar-sangue e verificados quanto à correta inserção do vetor no genoma do parasito. Isso foi realizado através de ampliações utilizando iniciadores *forward* localizados na região à montante da ORF de Rad51, fora da região utilizada para integração do vetor e iniciadores *reverse* localizados dentro do gene de resistência a higromicina como mostrado na figura 14. Como controle positivo foi realizada amplificação da ORF de Rad51 presente no heminocaute (Figura 14). O sequenciamento dessas regiões também foi realizado para confirmar a deleção de um dos alelos do gene TcRad51. Na figura 15 está o alinhamento dos dois alelos de Rad51 dos parasitos selvagens com os alelos de Rad51 dos parasitos heminocautes, juntamente com o início do gene de resistência a higromicina. Esse alinhamento mostra a presença de um alelo intacto (Rad51 (-/+)) e um deletado (Rad51::Hig (-/+)) de TcRad51 nos parasitos heminocautes, esse último mostrando a homologia com o gene de resistência a higromicina que substitui a ORF de Rad51 (Figura 15).

### **2.1. Análise da expressão da proteína Rad51 dos parasitos transfectados**

Para avaliar se a deleção de um dos alelos de TcRad51 afeta os níveis da proteína TcRad51, anticorpos anti-TcRad51 foram gerados. Com esse objetivo, foram realizadas a expressão heteróloga da proteína recombinante Rad51-his em *E. coli* e a purificação dessa para a imunização de camundongos com essa proteína. Os anticorpos gerados também propiciaram a avaliação da localização de TcRad51 durante o reparo de DSBs.



**Figura 14: Geração de heminocautes de TcRad51 em *T. cruzi*.** A) Representação da construção utilizada para geração de heminocaute e do locus de TcRad51 no genoma antes e após a integração do vetor. A região de 500 pb das sequências *upstream* ou *downstream* da ORF de TcRad51 que permitiram a integração da construção estão indicadas em verde escuro. A região codificadora de TcRad51 foi substituída pelo gene que confere resistência a higromicina. B) Análises de PCR de *T. cruzi* transfectados com construções para geração de heminocautes de TcRad51. Nessas amplificações foram utilizados iniciadores representados pelas setas na figura ao lado de cada gel de agarose. Marcadores de tamanho de pares de bases estão indicados à direita do gel de agarose. C-: controle negativo da PCR; +/- Rad51: parasitos transfectados com a construção para deleção de um dos alelos contendo o cassette de higromicina.



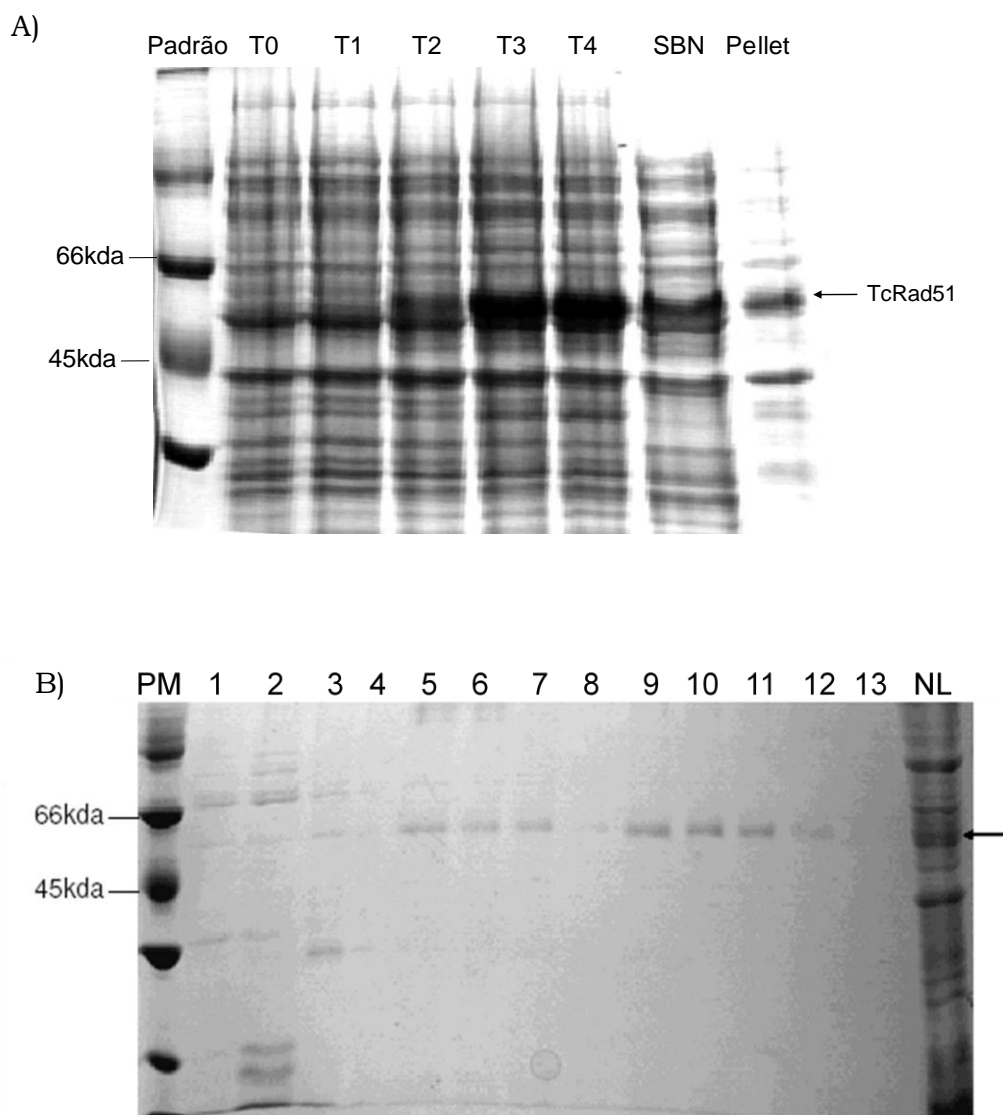
**Figura 15: Alinhamento de seqüências de DNA dos alelos de Rad51 dos parasitos selvagens e heminocautes de TcRad51.** Sequências de DNA dos dois alelos de TcRad51 compreendendo 600 pb *upstream* da ORF de TcRad51 e 140 pb dessa ORF, além da seqüência de DNA do gene da higromicina fosfotransferase. Rad51-A1 (WT) e Rad51-A2 (WT): alelos de TcRad51 de células selvagens, Rad51 (-/+): alelo intacto de TcRad51 das células *TcRad51* -/+, Rad51::Hyg (-/+): alelo de TcRad51 deletado das células *TcRad51* -/+ e Hyg; início do gene da higromicina fosfotransferase. O retângulo vermelho indica uma região *upstream* a seqüência do vetor utilizado para a deleção demonstrando a presença dos dois alelos de TcRad51. O retângulo preto mostra o início da ORF de TcRad51 e o retângulo verde o início da ORF da higromicina fosfotransferase.



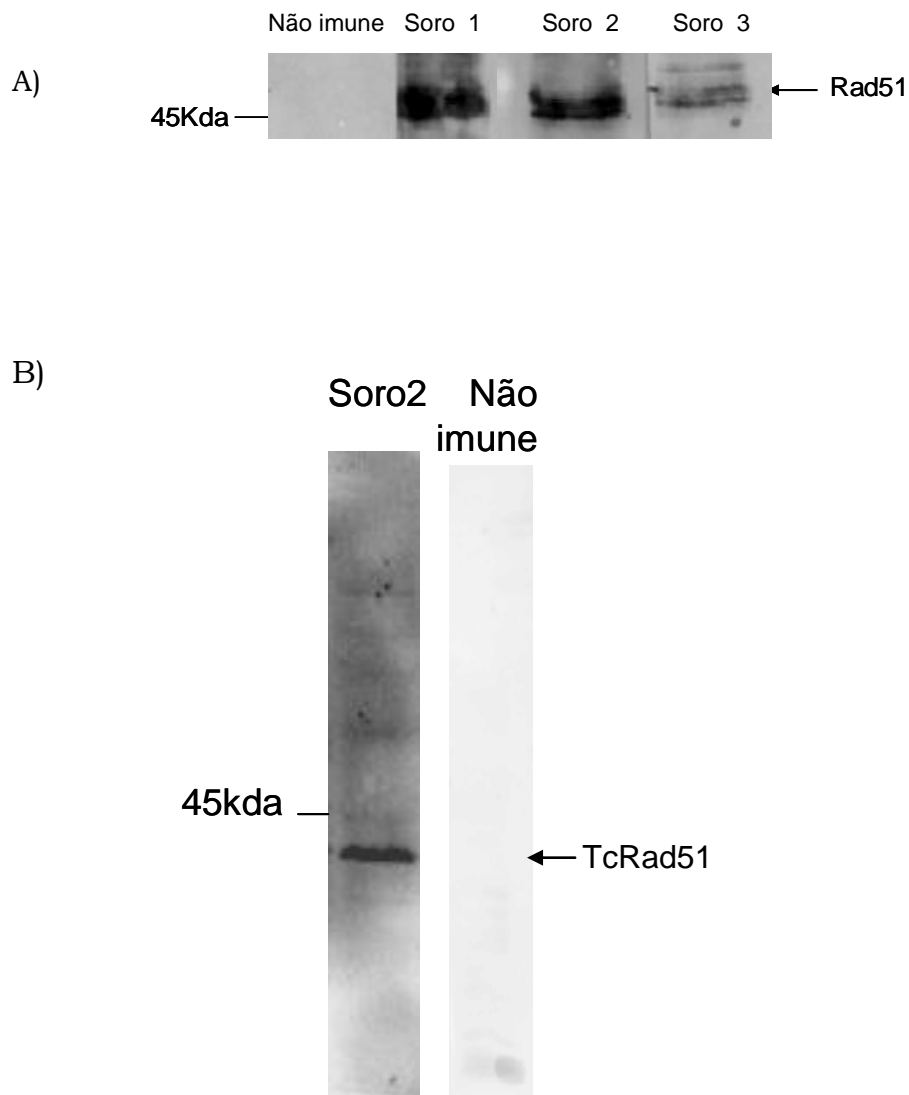
### 2.1.1. Obtenção de anticorpos anti-TcRad51

Para a obtenção da proteína TcRad51 recombinante em fusão com histidinas (TcRad51-his), foram utilizados iniciadores específicos que possibilitaram a amplificação do gene TcRad51. Esses iniciadores continham em uma das extremidades sítios para enzimas de restrição que permitiram a clonagem de TcRad51 no vetor pET que possibilita a expressão da proteína recombinante em fusão com histidina na extremidade C-terminal. Resultados de análise por SDS-PAGE mostrando expressão em pequena escala da proteína TcRad51, a análise da solubilidade dessa proteína e a purificação em coluna de níquel através do aparelho AKTADesign (GE) estão representados na figura 16. Foi possível verificar a indução da expressão da proteína de tamanho esperado (48 kDa), através do aumento da intensidade da banda após a indução por IPTG, como também a presença dessa proteína na fração solúvel do lisado bacteriano (Figura 16A). Utilizando essa fração, foi possível purificar a proteína TcRad51-his através de cromatografia de afinidade, como pode ser visto na figura 16B.

Com o objetivo de produzir anticorpos específicos contra a proteína TcRad51, três camundongos foram imunizados com a proteína purificada e seus soros testados através de ensaio por *western blot* (Figura 17). Todos os soros referentes à última imunização dos camundongos imunizados reconheceram a proteína purificada. Enquanto o soro do camundongo não imunizado não reconheceu essa proteína (Figura 17A). Um dos soros de camundongos imunizados foi testado quanto à reatividade em extratos protéicos de *T. cruzi*. Esse soro reconheceu somente uma banda em extratos celulares de epimastigotas do clone CL Brener, correspondente ao tamanho



**Figura 16 - Expressão e purificação da proteína TcRad51-his.** A) Expressão em pequena escala da proteína de fusão TcRad51-his em extrato total de *E. coli*, com aumento da produção da proteína de aproximadamente 48 kDa (seta preta) e a verificação da solubilidade da proteína analisando-se o precipitado insolúvel (pellet) e o sobrenadante solúvel (SBN); Marcadores de tamanho de proteína em KDa estão indicados à esquerda do gel de SDS-Page; alíquotas coletadas antes (T0) e 1h (T1), 2h (T2), 3h (T3) e 4h (T4) após a indução com IPTG e Padrão: Padrão de Peso Molecular. B) Purificação em coluna de níquel da proteína de fusão TcRad51-his; Canaletas 1 a 13: correspondem as diversas frações de 1 mL que foram coletadas durante o processo de eluição com imidazol da proteína da coluna de níquel. NL: correspondem as proteínas que não se ligaram a coluna e PM: Padrão de Peso Molecular. Marcadores de tamanho de proteína em KDa estão indicados à esquerda do gel de SDS-Page As amostras de A e B foram separadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS.



**Figura 17: Western blot da proteína TcRad51 utilizando anticorpos provenientes de soros de camundongos não imunizados (Não imune) e imunizados com TcRad51-his (soros 1, 2 e 3).** A) Detecção da proteína purificada de TcRad51-his (48Kda) B) Detecção da proteína TcRad51 em extratos protéicos de epimastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*. Marcadores de massa molecular em KDa estão indicados à esquerda do gel de SDS-Page. As amostras de A e B foram separadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS, transferidas para membranas e incubadas com soro contendo anticorpos anti-TcRad51 na diluição 1:2000 seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-camundongo IgG) na diluição de 1:10.000.

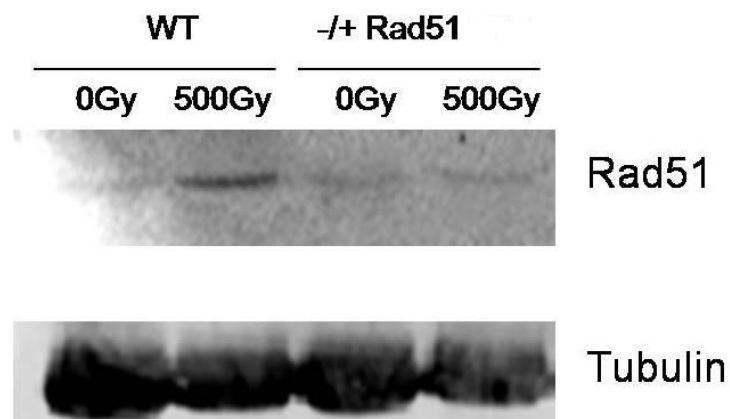
esperado da proteína nativa (aproximadamente 40 kDa) (Figura 17B). O soro do camundongo não imunizado não reconheceu nenhuma proteína no extrato protéico do parasito. Dessa forma, esse soro que foi capaz de reconhecer a proteína nativa de *T. cruzi* foi utilizado para os demais ensaios de *western blot* e localização celular da proteína TcRad51.

### **2.1.2. Western blot dos parasitos transfectados**

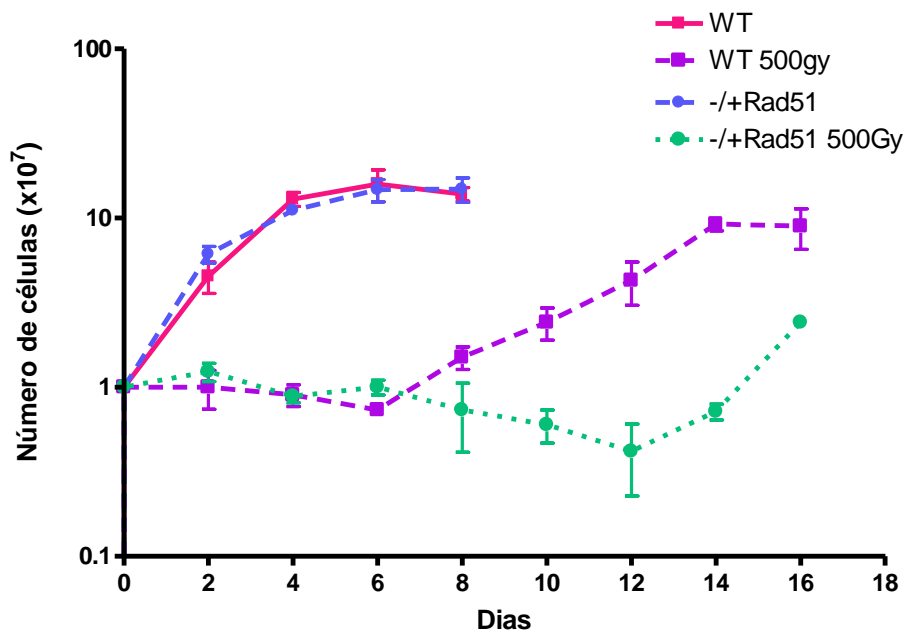
A expressão da proteína TcRad51 foi analisada através da técnica de *western blot* nas células selvagens e heminocautes antes e 24 horas após a exposição à radiação gama, um agente causador de quebras duplas (Figura 18). Observando-se os níveis protéicos aplicados no gel representado pela intensidade das bandas de tubulina, foi possível verificar que há uma indução da expressão de TcRad51 após 24 horas da radiação gama nas células selvagens. Na linhagem heminocaute, observa-se uma menor quantidade de proteína após a indução quando comparado com a cultura selvagem.

## **2.2. Parasitos heminocautes de TcRad51 apresentam maior sensibilidade à radiação gama**

A linhagem heminocaute de TcRad51 foi avaliada quanto ao crescimento após exposição à radiação gama. Nesse ensaio foi realizada uma curva de crescimento de parasitos selvagens e do clone heminocaute expostos à radiação gama na dose de 500 Gy (Figura 19). Observou-se que a deleção de um alelo não altera significativamente o crescimento das culturas na ausência de irradiação, dado que eles apresentam o mesmo perfil na curva de crescimento quando comparado com a cultura selvagem. Nas culturas expostas à radiação gama, verificou-se que todas as culturas não se dividem em um primeiro momento. Após esse período, os parasitos selvagens retomam



**Figura 18: Western blot para detecção de TcRad51 em extratos de culturas selvagens (WT) e heminocautes de TcRad51 (-/+ Rad51) na ausência de radiação (0 Gy) e 24 horas após a exposição à 500 Gy de radiação gama.** A) Detecção da banda correspondente a TcRad51 (tamanho esperado: 40Kda). B) Detecção da banda correspondente a tubulina (tamanho esperado: 50Kda) As amostras foram separadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS, transferidas para membranas e incubadas com soro contendo anticorpos anti-TcRad51 na diluição 1:2000 ou anti-alpha tubulina na diluição 1:12000 seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-camundongo IgG) na diluição de 1:10.000 ou 1:12000.



**Figura 19: Curva de crescimento de *T. cruzi* selvagem (WT) e heminocaute de *TcRad51* (-/+Rad51) na ausência de radiação e irradiados com 500 Gy de radiação gama.** Esses parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $10^7$  epimastigotas.ml<sup>-1</sup>. Os valores mostrados correspondem à média de um experimento realizado em triplicata, e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

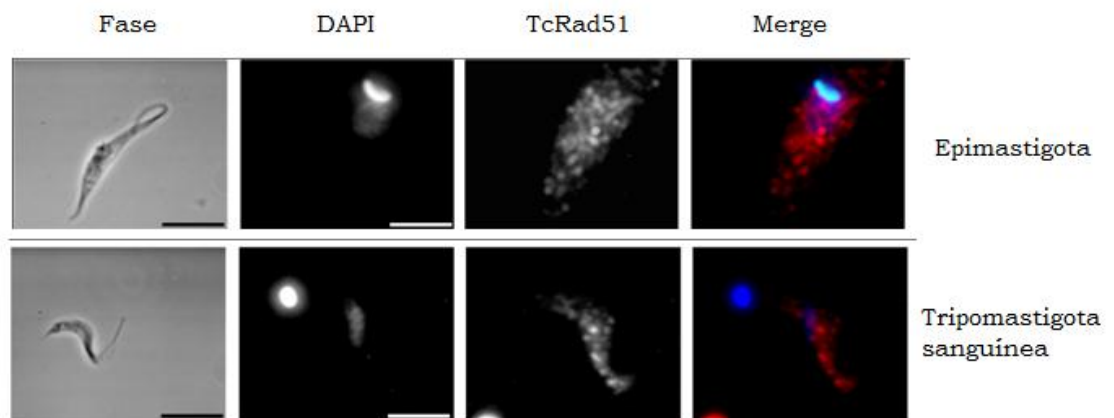
o crescimento antes que os parasitos heminocautes de TcRad51 (Figura 19). Esses resultados apresentados sugerem então que a deleção de um dos alelos de TcRad51 causa uma recuperação mais lenta dos parasitos após o tratamento com radiação gama.

### **3. Localização celular da proteína TcRad51 antes e após a exposição à radiação gama.**

Estudos têm mostrado que Rad51 forma foci discretos em complexos sub-nucleares em resposta a danos no DNA e que representam locais de reparo de DSBs (HAAF ET AL., 1995; RODRIGUE ET AL., 2006; VAN VEELLEN ET AL., 2005). Além disso, dado que diferentes níveis de Rad51 afetam a recuperação do *T. cruzi* após tratamento com radiação gama, foi verificado se a localização de Rad51 em *T. cruzi* também é afetada nas diferentes linhagens utilizadas neste trabalho após esse tratamento, permitindo assim um maior entendimento sobre o reparo de DSBs em *T. cruzi*.

Inicialmente, a localização da proteína TcRad51 foi observada nas formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas sanguíneas (formas infectivas não replicativas) de *T. cruzi*. Essa proteína se apresentou difusa por todo o corpo celular do parasito nas duas formas analisadas (Figura 20).

Como visto nesse trabalho, a proteína TcRad51 possui um papel crítico no reparo de quebras duplas de DNA. Portanto, com o objetivo de avaliar a cinética de localização de TcRad51 durante o reparo de DSBs em *T. cruzi*, os parasitos foram expostos ao tratamento com radiação gama e avaliados quanto a localização e a intensidade de fluorescência de TcRad51.

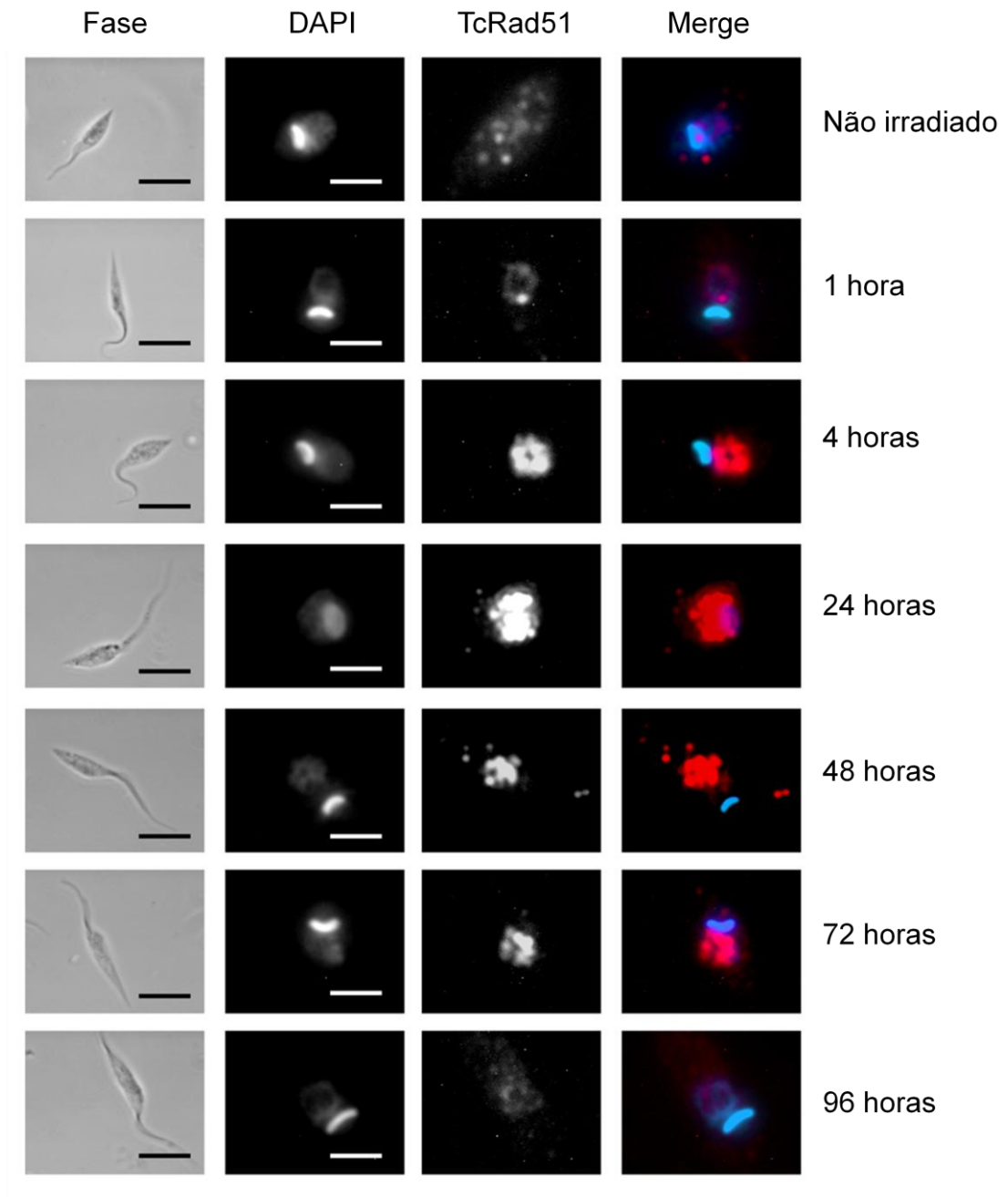


**Figura 20: Imunolocalização de TcRad51 em formas tripomastigotas sanguíneas e epimastigotas de *T. cruzi*.** Epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas foram marcadas com DAPI e com anticorpos anti-TcRad51 detectados com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 555. Barra preta: 5  $\mu$ m, Barra branca: 2  $\mu$ m.

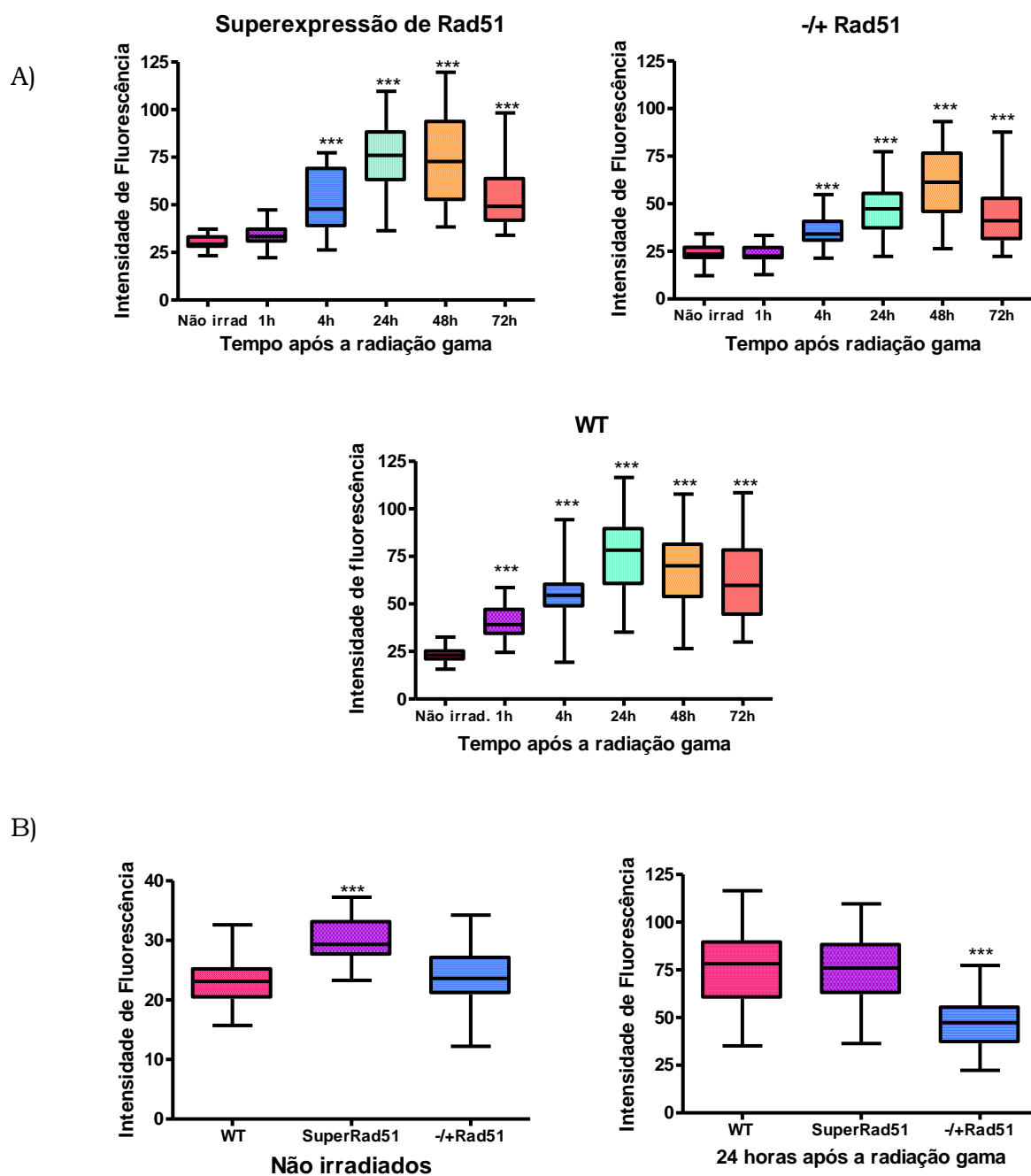


Os parasitos selvagens, superexpressores e heminocautes para TcRad51 foram analisados em diferentes períodos após a radiação (1, 4, 24, 28 e 72) através da quantificação da intensidade de fluorescência de TcRad51 no núcleo desses parasitos. A figura 21 mostra um acúmulo progressivo de TcRad51 no núcleo de parasitos selvagens logo após a radiação gama, indicando uma provável indução da expressão dessa proteína e a migração desta do citoplasma para o núcleo após a indução de lesões. Através da análise das imagens e quantificação da intensidade da fluorescência, foi possível verificar que nas horas seguintes após a exposição à radiação, a intensidade da fluorescência da proteína no núcleo dos parasitos selvagens aumenta até atingir o ápice em 24 horas (Figura 21 – 2º painel ao 4º painel e Figura 22). Dados da quantificação da fluorescência dos parasitos selvagens indicam que após 24 horas, a intensidade da fluorescência começa a decair para voltar aos níveis basais (figura 21 e 22).

Em contraste, parasitos heminocautes de TcRad51 apresentaram um atraso no acúmulo de proteínas TcRad51 no núcleo após a irradiação, com fluorescência máxima apenas após 48 horas (Figura 22A). Além disso, esses parasitos não atingiram os níveis máximos de fluorescência apresentados pelos parasitos selvagens. Por outro lado, os parasitos superexpressores de TcRad51 mostraram maior intensidade de fluorescência antes da irradiação quando comparado com as células selvagens (Figura 22B). No entanto, após a radiação, os níveis de fluorescência apresentados pelos parasitos superexpressores eram similares aos selvagens (Figura 22A e B). Em conjunto, esses dados sugerem que a alteração do nível de TcRad51 afeta a cinética de



**Figura 21: Imunolocalização de TcRad51 em formas epimastigotas de *T. cruzi* antes da irradiação (Não irradiado) e diferentes tempos (1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas) após a exposição à 500 Gy de radiação gama.** Epimastigotas foram marcadas com DAPI e com anticorpos anti-TcRad51 detectados com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 555. Barra preta: 5  $\mu$ m, Barra branca: 2  $\mu$ m.



**Figura 22: Intensidade de fluorescência de TcRad51 do núcleo de *T. cruzi* antes e após a radiação gama.** (A) A quantificação da fluorescência do núcleo de parasitos selvagens (WT), heminocautes de TcRad51 (-/+Rad51) e superexpressores de TcRad51 (Superexpressão de Rad51) estão mostrados antes da radiação (Não irradiad.) e diferentes tempos (1, 4, 24, 48 e 72 horas) após a exposição à radiação gama. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0.001$ ) na fluorescência de cada ponto em comparação com os parasitos não irradiados. (B) Parasitos selvagens (WT), heminocautes (-/+ Rad51) e superexpressores de TcRad51 (SuperRad51) estão mostrados antes da irradiação (Não irradiados) e 24 horas após a exposição à radiação gama. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0.001$ ) entre células selvagens e heminocautes ou células superexpressoras de TcRad51.

localização do TcRad51 no núcleo após a lesão, indicando que a localização e a concentração de TcRad51 são importantes para a eficiência do reparo de DSBs e para recuperação do crescimento dos parasitos.

#### **4. Análise do papel de TcRad51 no reparo de lesões geradas por diferentes agentes genotóxicos.**

Além de seu papel central no reparo de DSBs, a recombinação homóloga também está envolvida no reparo de *crosslinks* e proporciona apoio crucial na replicação do DNA. Lesões no DNA que interferem com a progressão de DNA helicases ou polimerases replicativas levam ao bloqueio da forquilha de replicação produzindo *gaps* ou DSBs unilaterais. Essas lesões podem ser toleradas ou reparadas pela HR, permitindo o reinício da forquilha de replicação (LI; HEYER, 2008). Dessa forma, foi avaliado o papel de Rad51 em *T. cruzi* no reparo de lesões que possam causar o bloqueio da forquilha de replicação. Para atingir esse objetivo, os parasitos selvagens, superexpressores e heminocautes para TcRad51 foram expostos à agentes que causam lesões oxidativas (peróxido de hidrogênio) ou *crosslinks* no DNA, como a luz UV ou a cisplatina. Esses parasitos também foram tratados com Benzonidazol, principal composto utilizado no tratamento da doença de Chagas. No entanto, o mecanismo de ação dessa droga ainda precisa ser elucidado.

##### **4.1. Alteração nos níveis de Rad51 não afeta sensibilidade de *T. cruzi* a agentes causadores de *crosslinks* no DNA**

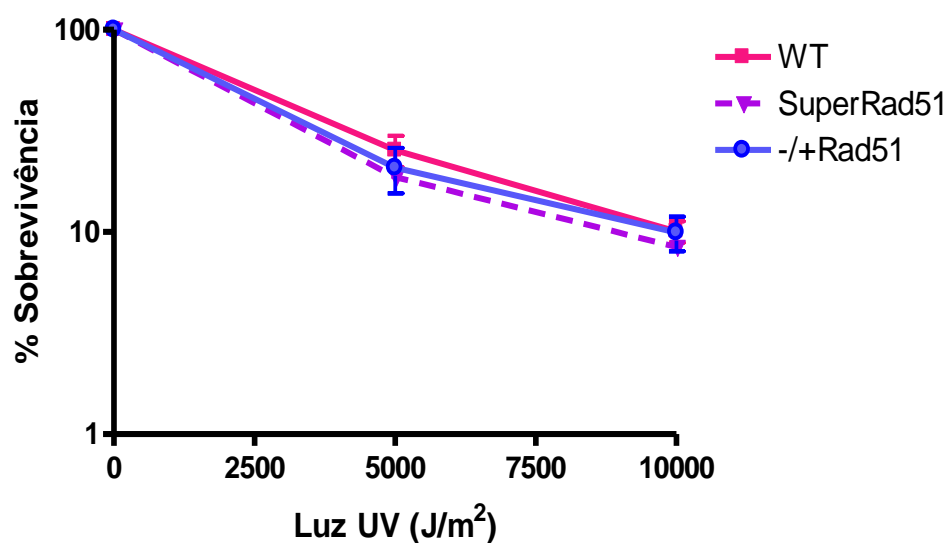
Os intra- e inter-*crosslinks* de DNA consistem em uma ligação covalente que é formada dentro de fitas de DNA ou entre fitas opostas, respectivamente. Essas lesões que podem ser geradas pela luz UV (intra-*crosslinks*) ou cisplatina (intra- ou inter-*crosslinks*) bloqueiam atividade celulares como a transcrição e a replicação (LEHOCZKÝ ET AL., 2007). Para determinar se

Rad51 está envolvida no reparo ou tolerância dessas lesões em *T. cruzi*, os parasitos selvagens, superexpressores e heminocautes para TcRad51 foram tratados com doses crescentes de luz UV e cisplatina (Figura 23). No entanto, não foram encontradas diferenças na sobrevivência entre esses parasitos em nenhuma das doses utilizadas de ambos agentes genotóxicos (Figuras 23). Em conjunto, os dados obtidos sugerem que TcRad51 não desempenha um papel central na resistência aos agentes envolvidos na geração de intra- ou inter-*crosslinks* de DNA em *T. cruzi*.

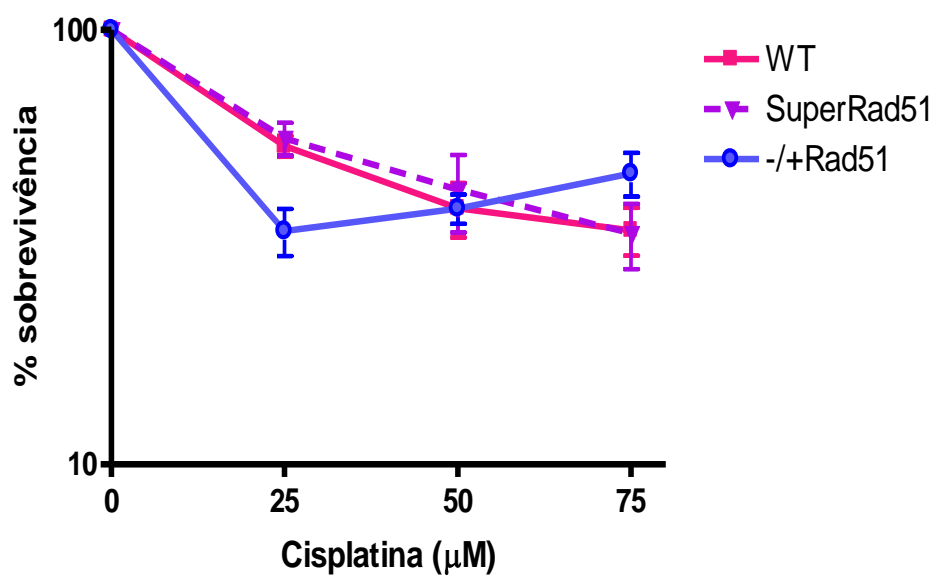
#### **4.2. Alteração nos níveis de Rad51 afeta sensibilidade de *T. cruzi* ao peróxido de hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio é responsável por gerar danos oxidativos no DNA, levando principalmente a lesões na base e no açúcar do DNA e quebras de fita simples (SSBs). Esse agente genotóxico também pode gerar sítios abásicos, *crosslinks* entre proteínas e DNA, e quebras de fita dupla quando duas ou mais modificações se situam próximas e em fitas opostas (SLUPPHAUG, 2003; STOHL; SEIFERT, 2006). Além disso, o processamento de bases oxidadas pode levar ao bloqueio da forquilha de replicação devido ao surgimento de SSBs, que podem então ser reparadas pela recombinação (CALDECOTT, 2001). Portanto, neste trabalho, a contribuição da recombinação no reparo de lesões oxidativas em *T. cruzi* será avaliada através do tratamento de linhagens selvagem, superexpressora de TcRad51 e células heminocautes de TcRad51 com peróxido de hidrogênio (Figura 24). Nas diferentes doses administradas, a cultura superexpressora apresentou uma maior resistência ao tratamento com esse agente que as culturas selvagens

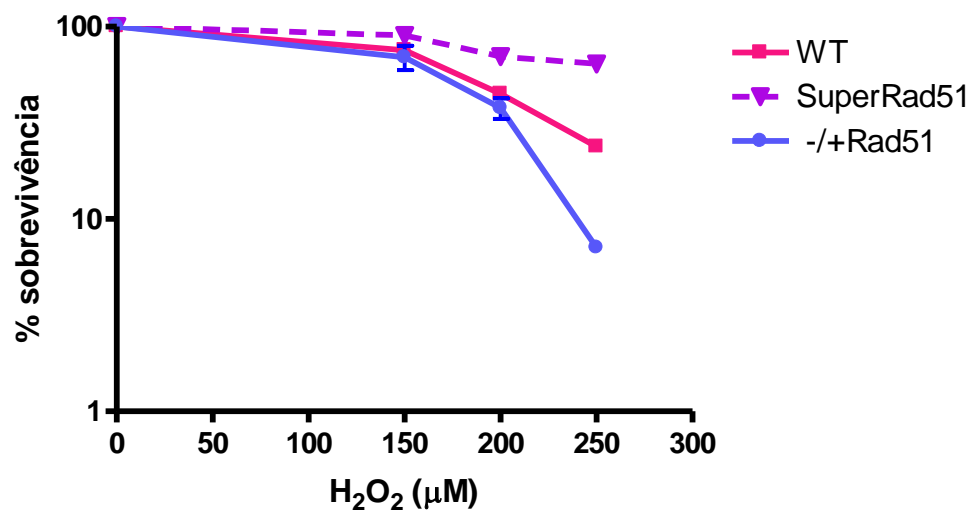
A)



B)



**Figura 23: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem (WT), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+ Rad51) tratados com agentes que causam *crosslinks*.** A) Parasitos selvagens (WT), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+ Rad51) irradiados com luz ultravioleta nas doses de 0, 5000 e 10000 J/m<sup>2</sup>. B) Parasitos selvagens (WT), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+ Rad51) tratados com cisplatina nas doses de 0, 25, 50 e 75 µM. Esses parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de 107 epimastigotas.ml<sup>-1</sup>. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.



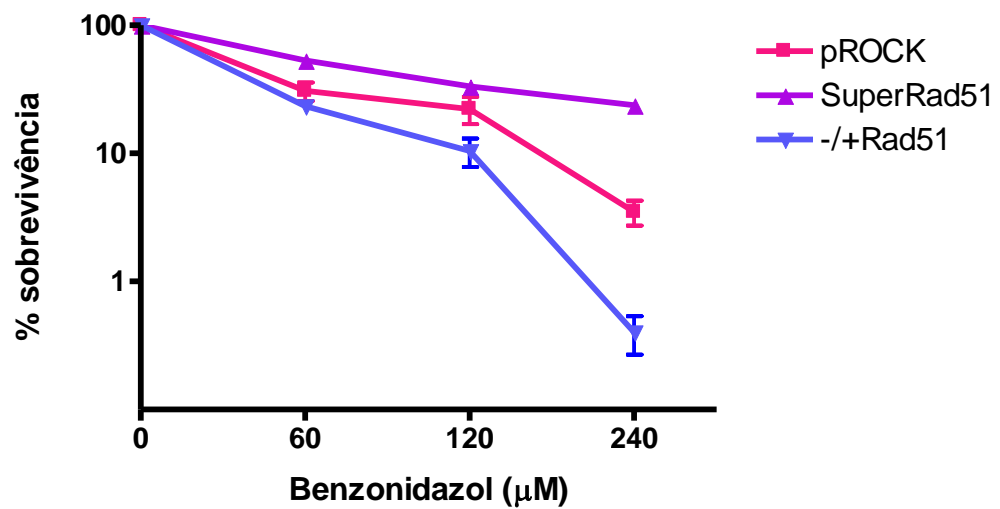
**Figura 24: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem (WT), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+Rad51) tratados com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas doses de 0, 150, 200 e 250  $\mu M$ .** Esses parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $10^7$  epimastigotas. $ml^{-1}$ . Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

enquanto que as células heminocautes de TcRad51 apresentaram maior sensibilidade (Figura 24). Dessa forma, em conjunto esses resultados indicam que Rad51 confere maior resistência aos parasitos *T. cruzi* à citotoxicidade de lesões oxidativas.

#### **4.3. Alteração nos níveis de Rad51 afeta sensibilidade de *T. cruzi* ao benzonidazol**

O benzonidazol, um derivado de nitroimidazol, é uma das drogas mais utilizadas no tratamento da doença de Chagas. Essa pró-droga precisa ser ativada por nitroredutases dentro do parasito para apresentar atividade tripanomicida (WILKINSON; KELLY, 2009). Apesar de alguns estudos indicarem que o Benzonidazol causa SSBs e DSBs no DNA mitocondrial e principalmente no DNA nuclear, seu mecanismo de ação ainda precisa ser elucidada. Tendo em vista esses dados, foi avaliado o papel de Rad51 na resistência do parasito *T. cruzi* a essa droga utilizando parasitos controle que foram transfectados com pROCK expressando somente o gene de resistência a higromicina (pROCK), superexpressores e heminocautes para TcRad51 (Figura 25). Na dose de 240  $\mu$ M, a cultura superexpressora apresentou uma maior resistência ao tratamento com esse agente que as culturas controle transfectadas com pROCK enquanto que as células heminocautes de TcRad51 apresentaram maior sensibilidade que as células controle nas doses de 120 e 240  $\mu$ M. Portanto, os níveis de TcRad51 afetam a resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol.





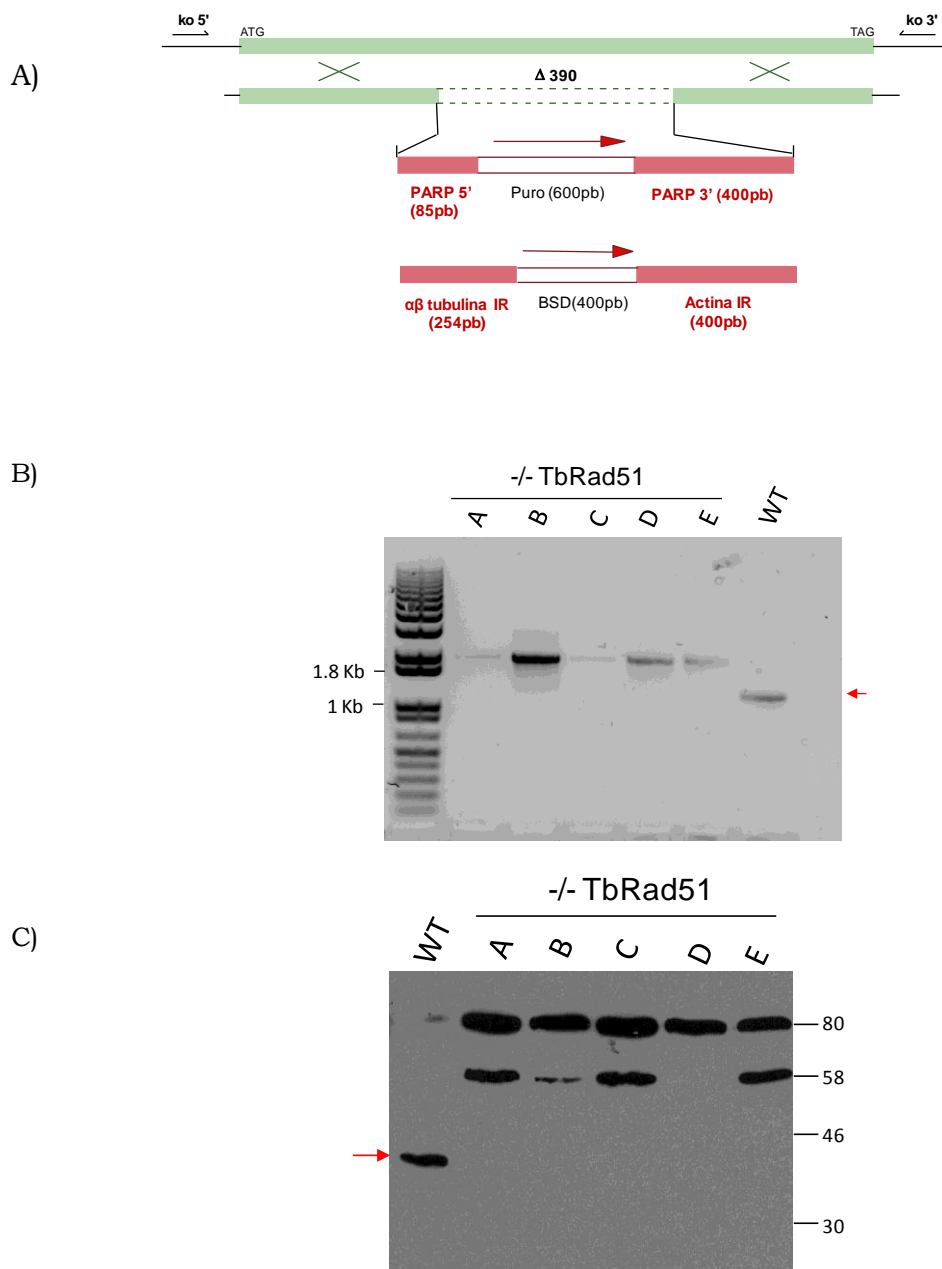
**Figura 25: Sobrevivência de *T. cruzi* selvagem transfetado com um plasmídeo expressando somente higromicina (pROCK), superexpressando TcRad51 (SuperRad51) e heminocautes de TcRad51 (-/+Rad51) tratados com benznidazol nas doses de 0, 60, 120 e 240 µM.** Esses parasitos foram cultivados em meio LIT em uma concentração inicial de  $10^7$  epimastigotas.ml<sup>-1</sup>. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

## **5. Papel de Rad51 de *T. brucei* no reparo de *crosslinks* e lesões oxidativas no DNA nesse organismo**

Os dados indicando que TcRad51 não possui uma função clara no reparo de *crosslinks* e participa no reparo de lesões oxidativas, nos levou a questionar o papel de Rad51 de *T. brucei*, um kinetoplastídeo relacionado, no reparo dessas lesões. Para atingir esse objetivo, foi adotada a estratégia de nocautear Rad51 em *T. brucei* e avaliar a suscetibilidade desses organismos a agentes que causam *crosslinks* e lesões oxidativas.

### **5.1. Geração de linhagens nocautes para Rad51 em *T. brucei***

A geração de nocautes para Rad51 de *T. brucei* foi realizada através da transfecção de construções que permitiram a deleção de 391 pb da região central da ORF que corresponde a 8 dos 12 sítios catalíticos da enzima, como descrito por McCulloch & Barry (1999). As construções utilizadas para geração de nocautes de Rad51 desenvolvidas no trabalho de McCulloch & Barry (1999) possuem genes de resistência a puromicina (puromicina N-acetiltransferase - PUR) e a fleomicina. O antibiótico fleomicina age através da geração de quebras duplas de DNA, e o gene de resistência a esse antibiótico codifica para uma proteína que se liga à fleomicina impedindo sua ação. Como um dos objetivos deste trabalho é avaliar o reparo de quebras duplas de DNA, os parasitos nocautes para Rad51 contendo o gene de resistência a fleomicina não foram utilizados. Dessa forma, novas linhagens nocautes para Rad51 em *T. brucei* foram desenvolvidas utilizando construções contendo gene de resistência a puromicina e gene de resistência a blasticidina (blasticidina S deaminase - BSD) flanqueados por regiões de homologia com Rad51 (Figura 26A).



**Figura 26: Análise por PCR e *western blot* de nocautes de TbRad51 em *T. brucei*.** A) Representação das construções utilizadas para geração de nocaute e da região do locus de TbRad51 que será deletado ( $\Delta 390$ ). As regiões de aproximadamente 350 pb das extremidades da ORF de TbRad51 que permitiram a integração da construção estão indicadas na representação do vetor. B) Análises de PCR de *T. brucei* transfectados com as duas construções para geração de nocautes de TbRad51. Nessas ampliações foram utilizados iniciadores representados pelas setas (Ko5' e Ko3') na figura A. Marcadores de tamanho de pares de bases estão indicados à esquerda do gel de agarose. WT: parasitos selvagens, A, B, C, D e E: clones transfectados com as construções para deleção de TbRad51. A seta vermelha indica o tamanho esperado do gene de TbRad51 intacto. C) *Western blot* para detecção dos níveis protéicos de TbRad51 em extratos de parasitos *T. brucei* selvagens (WT) e nocautes de TcRad51 (A, B, C, D e E). As amostras foram separadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS, transferidas para membranas e incubadas com soro contendo anticorpos anti-TbRad51 na diluição 1:200 seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-coelho IgG) na diluição de 1:2000. A seta vermelha indica o tamanho esperado da proteína TbRad51.

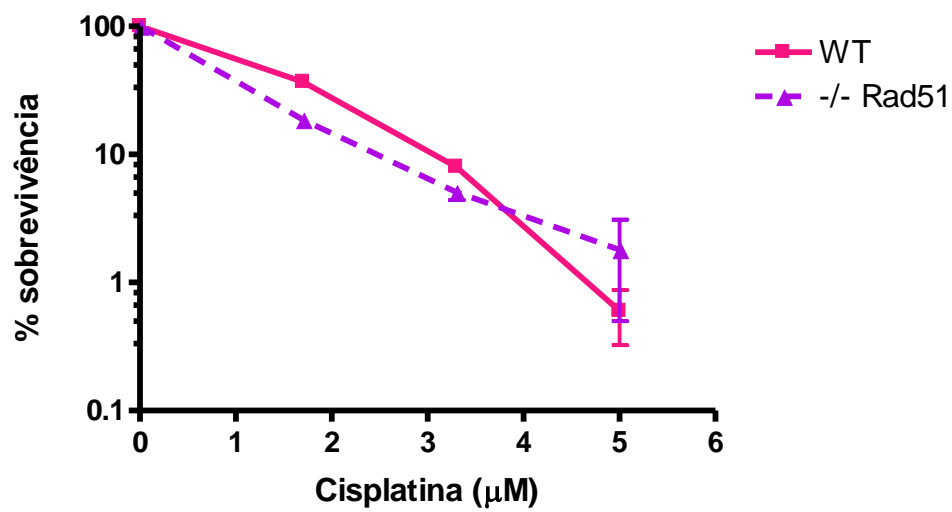
Essas construções, desenvolvidas por McCulloch (resultados não publicados; McCulloch & Barry, 1999), permitiram a deleção dos dois alelos de Rad51, através de transfecção e seleção com as duas construções descritas acima contendo genes de resistência a antibióticos distintos. Figura 26B mostra a amplificação por PCR utilizando iniciadores Ko5' e Ko3' (indicados por setas na figura 26A) que flanqueiam a ORF de Rad51 dos parasitos transformantes selecionados com os antibióticos puromicina e blasticidina.

Após a transfecção e seleção dos parasitos com as construções PUR e BSD, os parasitos transformantes apresentaram uma banda de 1,80 kb correspondente as construções PUR e BSD integradas no locus de Rad51, e não havia nenhum sinal do produto da PCR correspondente ao alelo selvagem (1,10 Kb), indicando que a integração das duas construções removeu Rad51 endógeno do seu locus (Figura 26B).

Análises de *western blot* mostraram a ausência da banda correspondente à proteína Rad51 nos parasitos transfectados, mais uma vez indicando que Rad51 foi removido e, portanto, não está sendo traduzido, nesses parasitos (Figura 26C). Bandas inespecíficas de alto peso molecular também foram reveladas nesse *western blot*, similarmente ao mostrado em Dobson (2009).

## **5.2. Nocaute de TbRad51 não afeta sensibilidade de *T. brucei* à cisplatina**

Com o objetivo de verificar o papel de Rad51 no reparo de *crosslinks* em *T. brucei*, parasitos selvagens e nocautes para TbRad51 foram tratados com três diferentes doses de cisplatina (Figura 27). Em nenhuma das doses utilizadas houve diferença de sensibilidade entre os parasitos selvagens e



**Figura 27: Sobrevivência de *T. brucei* selvagem (WT) e nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) tratados com cisplatina nas doses de 1,7, 3,3 e 5,0  $\mu\text{M}$ .** Esses parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  parasitos. $\text{ml}^{-1}$ . Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

nocautes para TbRad51. Esses dados indicam que Rad51 não está envolvido no reparo de crosslinks de DNA em *T. brucei* ou apenas apresenta uma pequena participação no reparo dessas lesões.

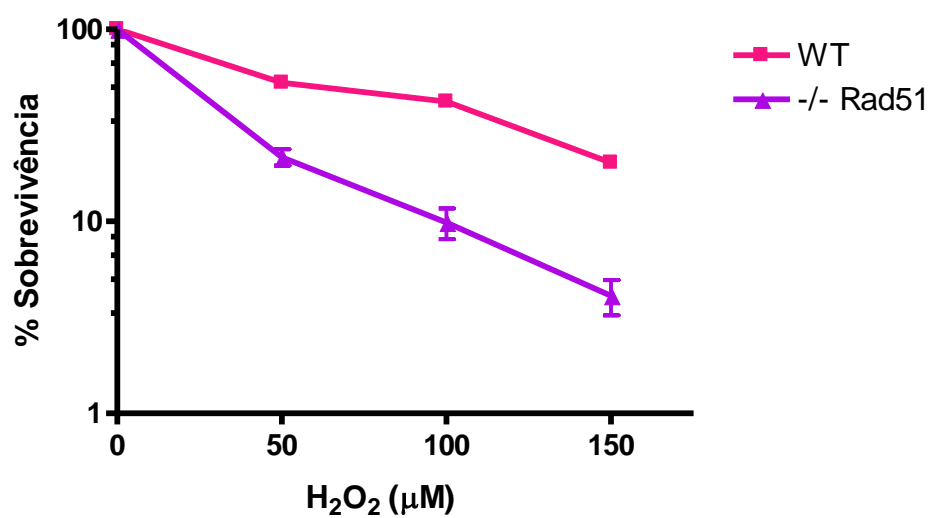
### **5.3. Nocaute de TbRad51 aumenta sensibilidade de *T. brucei* ao peróxido de hidrogênio**

A contribuição de Rad51 de *T. brucei* para o reparo de lesões oxidativas no DNA desses parasitos também foi avaliada através do tratamento com peróxido de hidrogênio de células nocautes para TbRad51. A deleção de Rad51 de parasitos *T. brucei* causou um aumento na sensibilidade ao peróxido de hidrogênio desses parasitos em comparação com as células selvagens em todas as doses testadas (Figura 28). Esses dados indicam que Rad51 de *T. brucei*, assim como de *T. cruzi*, possui um papel na resistência ao peróxido de hidrogênio, provavelmente devido ao reparo ou tolerância de lesões oxidativas mediadas por essa proteína.

## **6. Comparação das proteínas TcRad51 e TbRad51 em *T. brucei***

O parasito *T. cruzi* apresenta uma alta resistência à radiação gama, como mostrado anteriormente. Em contraste, o *T. brucei* é sensível a doses dez vezes menores que as utilizadas em *T. cruzi*. Como esse agente genotóxico causa quebras duplas no DNA que são reparadas principalmente por recombinação homóloga, experimentos foram realizados para verificar se Rad51, a proteína chave da HR, é uma das responsáveis pelas diferenças de suscetibilidade entre esses organismos.

O desenvolvimento de linhagens nocautes de Rad51 de *T. brucei* e a posterior expressão de TbRad51 ou TcRad51 foi a estratégia adotada para analisar as diferenças de atividade entre Rad51 de *T. cruzi* e *T. brucei*.



**Figura 28: Sobrevivência de *T. brucei* selvagem (WT) e nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nas doses de 50, 100 e 150 μM.** Esses parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  parasitos.ml<sup>-1</sup>. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas e as barras correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

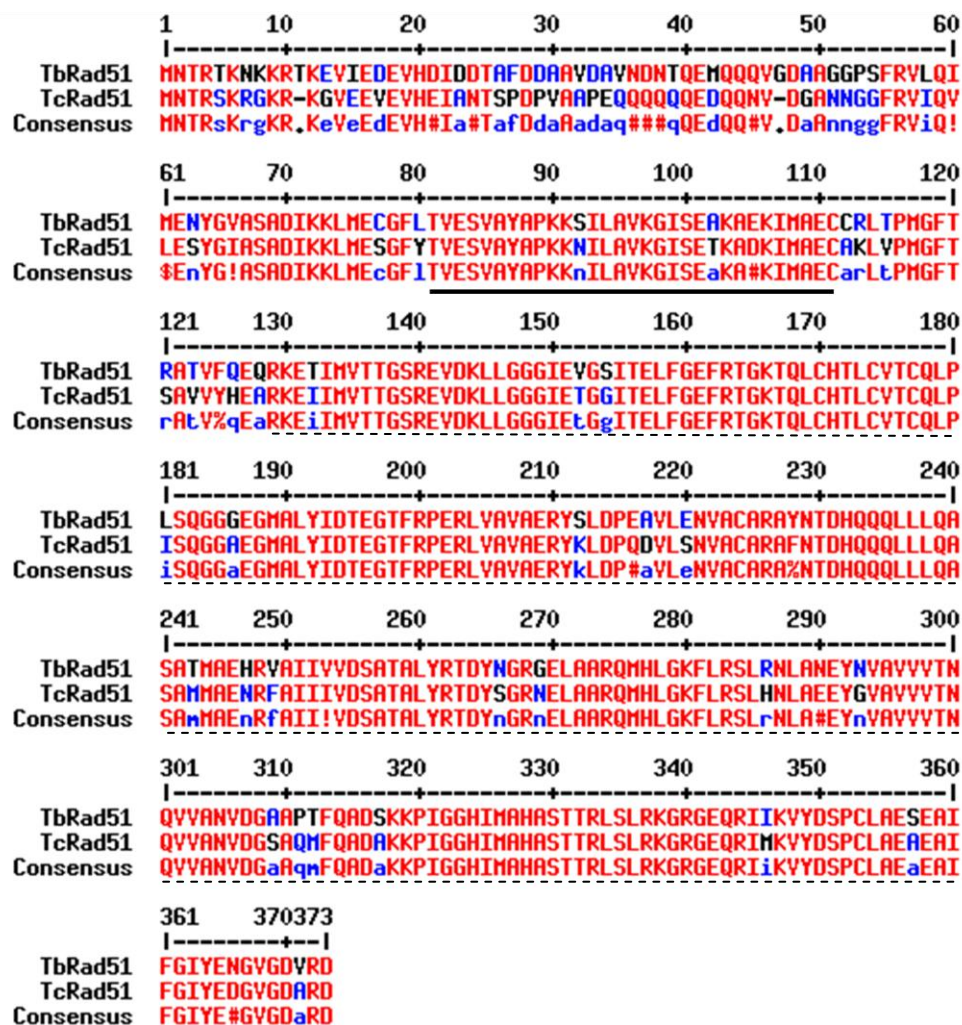
Caso Rad51 de *T. cruzi* fosse capaz de interagir com as proteínas da HR de *T. brucei*, complementando assim essa via de reparo, seria possível comparar a atividade de Rad51 proveniente de *T. cruzi* e *T. brucei in vivo*.

O alinhamento das sequências das duas proteínas está representado na figura 29. As proteínas Rad51 dos parasitos apresentam uma similaridade de 66%. A região N-terminal é a mais divergente entre as duas proteínas. No motivo de ligação ao DNA (motivo helix-hairpin-helix), comparando a proteína TbRad51 com a TcRad51, há duas substituições: uma serina por uma asparagina na posição 92 e de uma alanina por uma treonina na posição 102, sendo essa última substituição de um aminoácido apolar por um polar neutro. Além disso, está destacada na figura 29 a região correspondente a região de ligação aos motivos BRC de BRCA2 de Rad51 humano que se concentra na região C-terminal.

### **6.1. Geração e análise de linhagens *T. brucei* nocautes para TbRad51 e transfectados com TcRad51 ou TbRad51**

Para os estudos de complementação *in vivo*, tanto o Rad51 de *T. cruzi* como o de *T. brucei* foram clonados no vetor pRM482 para transfecção em linhagem de *T. brucei* Rad51 *-/-* descritos anteriormente. A integração dessa construção no genoma de *T. brucei* foi possível devido às regiões intergênicas de tubulina flanqueando a construção linearizada. Assim, esse vetor integra-se no DNA substituindo uma região de  $\alpha$ -tubulina, como demonstrado na figura 30A. As sequências intergênicas de actina e tubulina direcionam o *trans-splicing* e a poliadenilação do Rad51 e do gene de resistência a neomicina (neomicina fosfotransferase - NEO) após a integração.

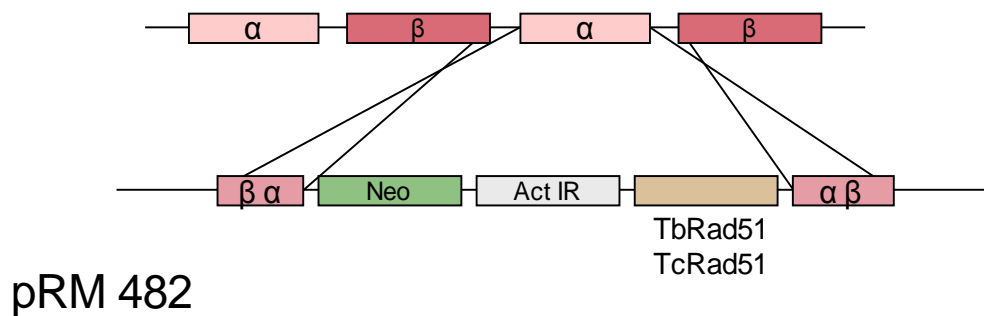




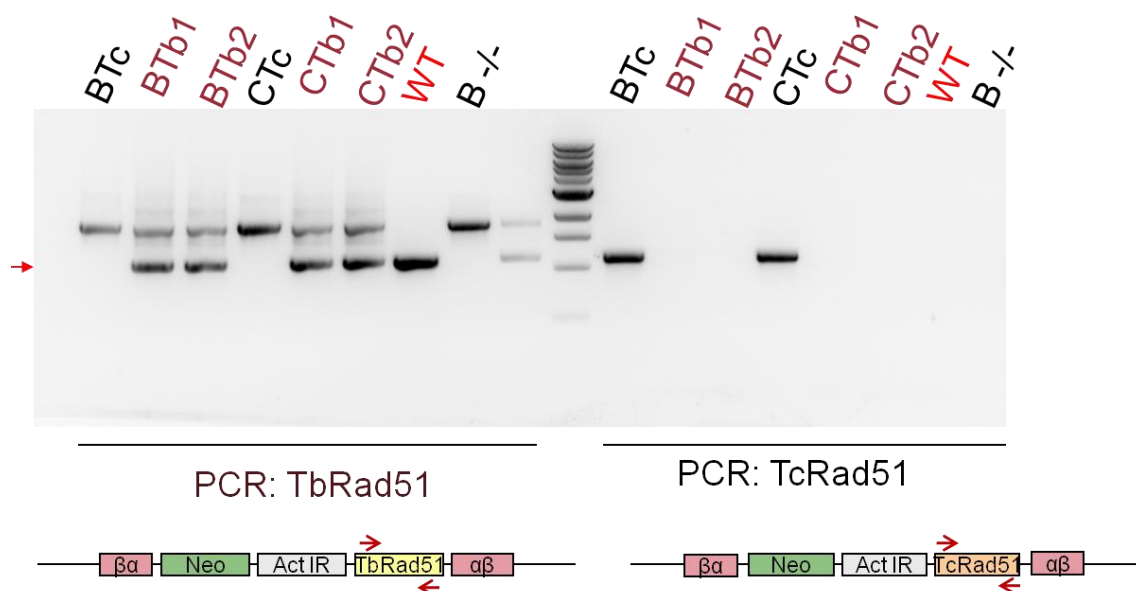
**Figura 29: Alinhamento das seqüências protéicas de TcRad51 e TbRad51.**

Seqüências de DNA sublinhadas corresponde a aminoácidos que forma o motivo helix-hairpin-helix que se liga ao DNA. Linhas pontilhadas correspondem à possível região referente à interação de Rad51 humana com BRCA2.

A)



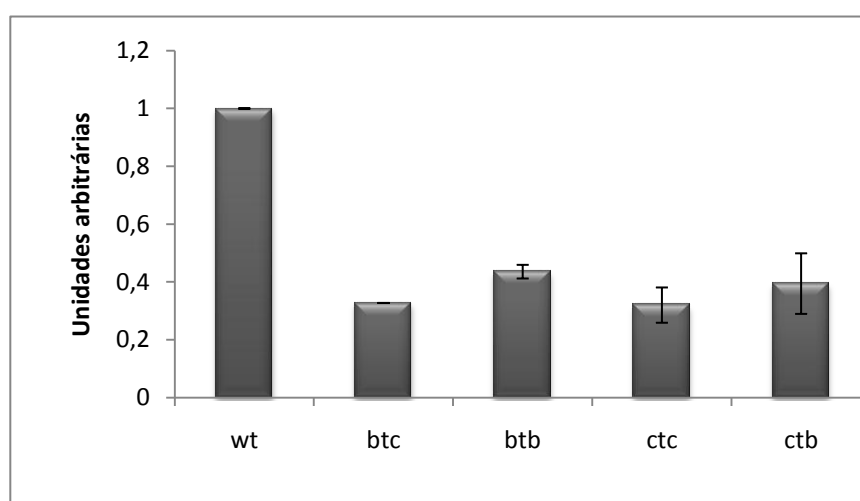
B)



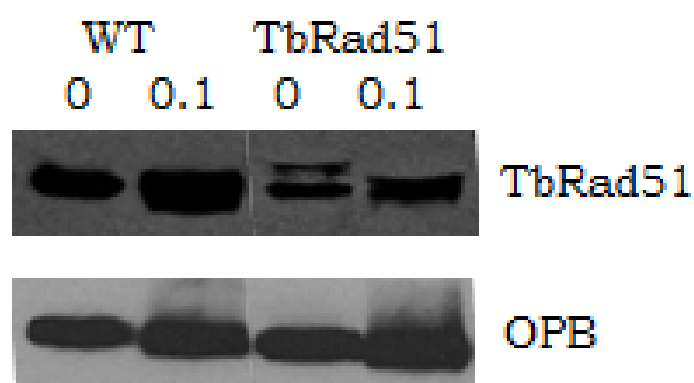
**Figura 30: Análise por PCR de parasitos *T. brucei* nocautes para TbRad51 transfectados com TcRad51 ou TbRad51.** A) Representação da construção utilizada para geração de parasitos expressando TcRad51 ou TbRad51 e da região do locus de tubulina onde a construção será integrada. As regiões de homologia com tubulina que permitiram a integração da construção estão representadas no vetor. B) Análises de PCR de *T. brucei* nocautes para TbRad51 transfectados com construções contendo TcRad51 ou TbRad51 para geração de nocautes de TbRad51 expressando esses genes. Nessas amplificações foram utilizados iniciadores para a ORF de TcRad51 ou TbRad51 representados pelas setas vermelhas no esquema abaixo do PCR correspondente. Marcadores de tamanho de pares de bases estão indicados na região central do gel de agarose. WT: parasitos selvagens, BTc e CTc: parasitos nocautes para TbRad51 (clones B e C, respectivamente) transfectados com TcRad51, BTb1, BTb2, CTb1 e CTb2: parasitos nocautes para TbRad51 (clones B e C, respectivamente) transfectados com TbRad51. A seta vermelha indica o tamanho esperado do gene de TbRad51 e TcRad51.

Os parasitos nocautes para TbRad51 transfectados (clones B e C) foram selecionados através da resistência ao antibiótico neomicina e a integração de Rad51 foi confirmada por PCR utilizando iniciadores para ORF de Rad51 de *T. brucei* e *T. cruzi* (TbRad51 e TcRad51, respectivamente) (Figura 30B). A banda de 1.1 Kb referente à presença da ORF de Rad51 foi detectada nas amplificações para TbRad51 em parasitos transfectados com TbRad51 (Rad51-/-/+) (clones BTb1, BTb2, CTb1 e CTb2) e nas amplificações para TcRad51 em parasitos transfectados com TcRad51 (Rad51-/-/Tc) (clones BTc e CTc). Para a amplificação de TbRad51, um controle positivo do PCR foi realizado com DNA genômico de *T. brucei* selvagem (WT) e dois controles negativos com DNA genômico do nocaute para Rad51 (Rad51 -/-) e das células transfectadas com TcRad51. Os parasitos selvagens, nocautes e transfectados com TbRad51 foram utilizados como controle negativo para a amplificação de TcRad51. Para verificar a quantidade de cópias de Rad51 integradas no genoma dos parasitos transfectados, foi realizado PCR em tempo real. Quando comparado com as células selvagem, os parasitos transfectados apresentaram cerca de metade do número de cópias de Rad51 (TcRad51 ou TbRad51), o que corresponde a uma cópia, dado que há dois alelos endógenos nos parasitos selvagens (Figura 31).

Análises de *western blot* mostraram que os níveis protéicos de TbRad51 nas células *Rad51-/-/+* foram menores do que as células WT, tanto na ausência quanto na presença de fleomicina. Diferentemente de *T. cruzi*, *T. brucei* selvagem ou *Rad51-/-/+* não induzem a expressão da proteína TbRad51 após o tratamento com agentes que causam quebras duplas no DNA. *Western blot* com anticorpos anti-OPB foram utilizados como controle endógeno (Figura 32).



**Figura 31: PCR em tempo real para análise do número de cópias integradas dos parasitos *T. brucei* nocautes para TbRad51 transfectados com TcRad51 ou TbRad51.** Gráfico mostrando a quantificação relativa do número de cópias de Rad51 em relação aos parasitos selvagens. WT: parasitos selvagens, BTc e CTc: parasitos nocautes para TbRad51 (clones B e C, respectivamente) transfectados com TcRad51, BTb e CTb: parasitos nocautes para TbRad51 (clones B e C, respectivamente) transfectados com TbRad51.



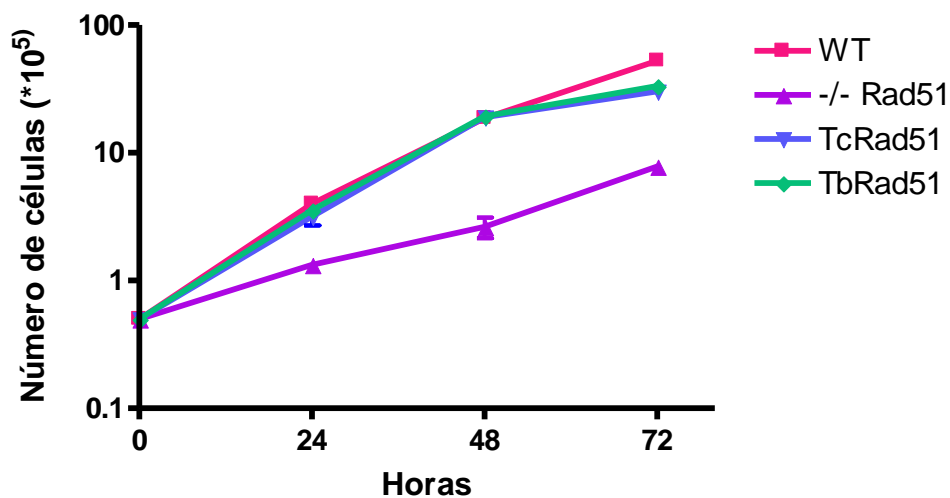
**Figura 32: Western blot para detecção dos níveis protéicos de TbRad51 em extratos das culturas selvagens (WT) e nocautes de TbRad51 transfectados com TbRad51 (TbRad51) na ausência (0) e presença de 0.1  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de fleomicina (0.1).** Detecção da banda correspondente a TbRad51 e do controle OPB (oligopeptidase B). As amostras foram separadas em gel de acrilamida 10% na presença de SDS, transferidas para membranas e incubadas com soro contendo anticorpos anti-TbRad51 na diluição 1:200 ou anti-OPB na diluição 1:2000 seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-coelho IgG na diluição de 1:2.000 ou anti-ovelha IgG 1:12000.

## **6.2. TcRad51 é capaz de complementar parasitos *T. brucei* nocautes para TbRad51 quanto ao crescimento**

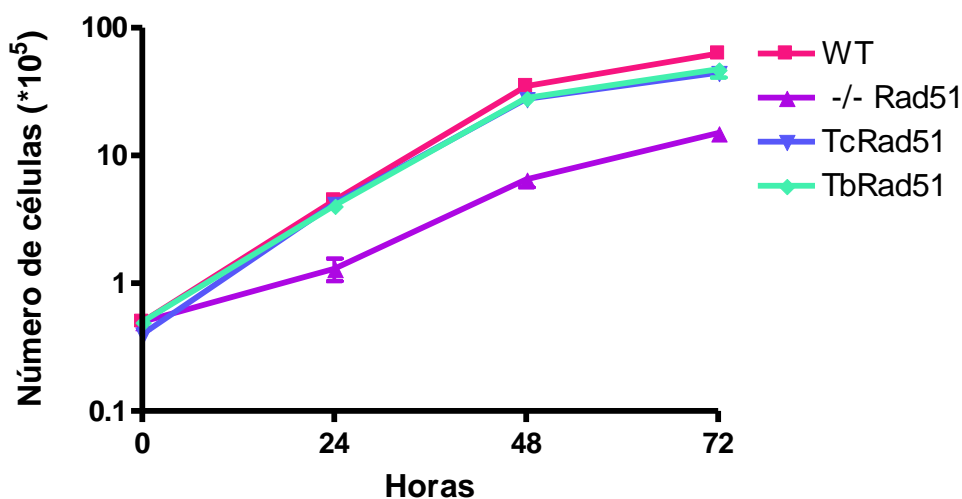
Resultados anteriores descritos por McCulloch (1999) mostraram que a deleção de Rad51 causa uma redução na taxa de crescimento de parasitos *T. brucei* nocautes para esse gene quando comparados com as células selvagens. Além disso, os parasitos deficientes em Rad51 atingem a fase estacionária da curva de crescimento com uma densidade menor. Parasitos *T. brucei* nocautes para Rad51 desenvolvidos nesse trabalho apresentaram fenótipos similares aos descritos no trabalho anterior. O crescimento das células foi acompanhado durante três dias consecutivos, com contagens após 24, 48 e 72 h (Figura 33).

Os parasitos re-expressores Rad51-/-/+ (clones BTb e CTb) e Rad51-/-/Tc (clones BTc e CTc) também foram analisados quanto à taxa de crescimento. Ambos apresentaram curvas de crescimento similares aos parasitos selvagens, indicando que Rad51 exógeno integrado no genoma foi capaz de complementar o nocaute nesse fenótipo. Os parasitos Rad51-/-/+ apresentaram níveis de expressão de TbRad51 capazes de complementar o fenótipo relacionado a taxa de crescimento, apesar dos níveis protéicos serem menores que o selvagem. Por outro lado, TcRad51 foi capaz de interagir com a maquinaria de HR de *T. brucei* e complementar *T. brucei* nocautes para TbRad51 quanto à taxa de crescimento.

A)



B)



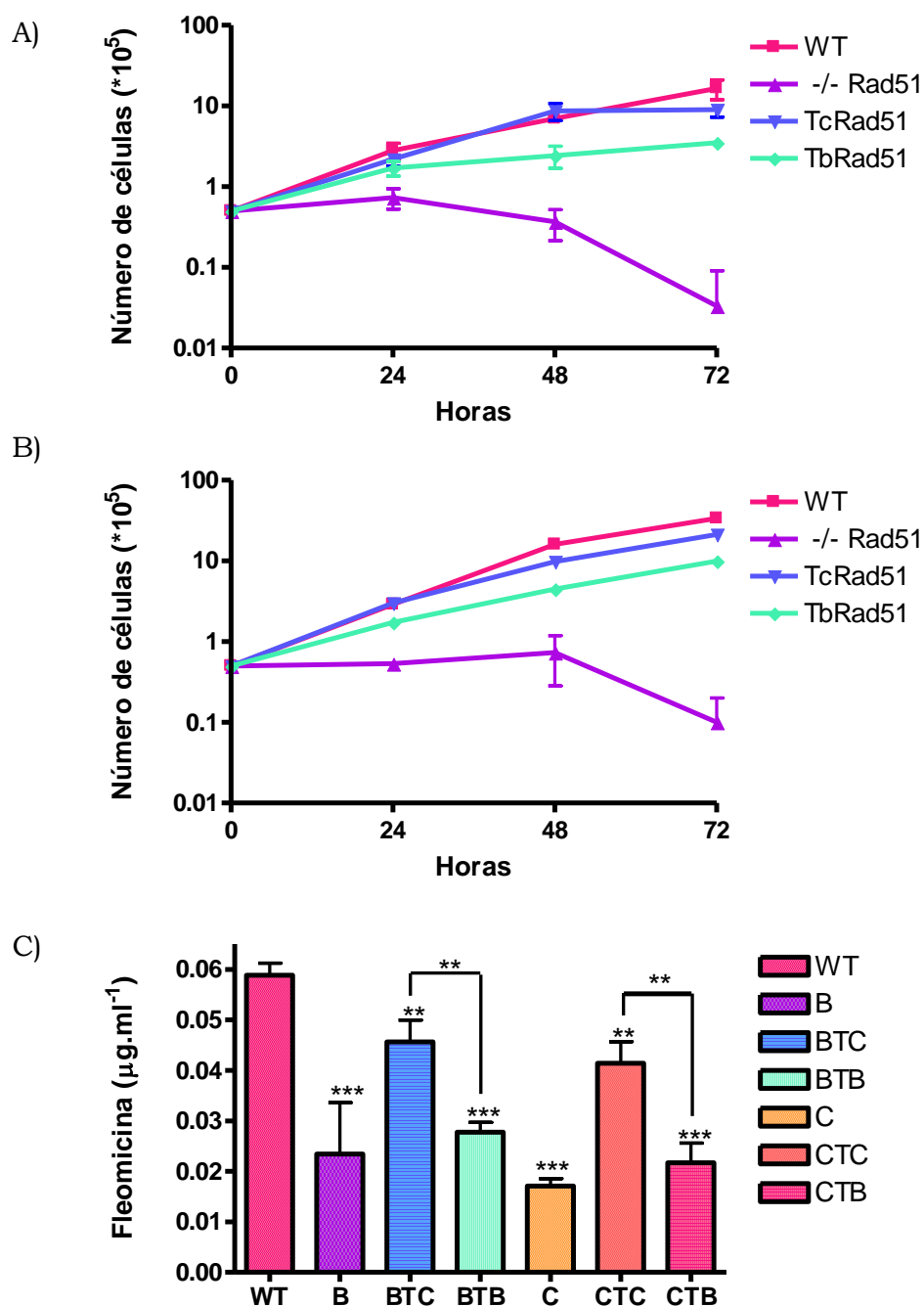
**Figura 33: Curva de crescimento de *T. brucei* selvagem (WT), nocaute para TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51).** A) Parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (Clone B (-/+ Rad51) e expressando TcRad51 (Clone BTc (TcRad51)) ou TbRad51 (Clone BTb (TbRad51)). B) Parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (Clone C (-/+ Rad51) e expressando TcRad51 (Clone CTc (TcRad51)) ou TbRad51 (Clone CTb (TbRad51)). Esses parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  parasitos.ml<sup>-1</sup>. Os valores mostrados correspondem à média de um experimento realizado em triplicata.

### **6.3. Análises de sensibilidade a agentes que causam quebras duplas no DNA de parasitos *T. brucei* nocautes para Rad51 e complementados com TcRad51 ou TbRad51**

A eficiência de TcRad51 e TbRad51 no reparo de quebras de fita dupla de DNA foi comparada através do tratamento com fleomicina e MMS de parasitos *T. brucei* selvagens, nocautes para TbRad51 e nocautes expressando TbRad51 e TcRad51. MMS é um agente alquilante que pode modificar guaninas (para 7-metilguanina) e adeninas (para 3-metiladenina) (BERANEK, 1990; LUNDIN ET AL., 2005). Além desses danos, o MMS gera quebras de fita simples e quebras de fita dupla, mas não se sabe ao certo se ele causa diretamente essas quebras de fitas de DNA ou se é resultado de eventos de reparo de DNA como, por exemplo, o reparo por excisão de base ou pelo colapso da forquilha de replicação (WYATT; PITTMAN, 2006). Fleomicina é um glicopeptídeo radiomimético pertencente ao grupo da bleomicina. Essa droga causa quebras de fita simples e dupla no DNA através de um mecanismo baseado em radicais livres (KESZENMAN ET AL., 1992).

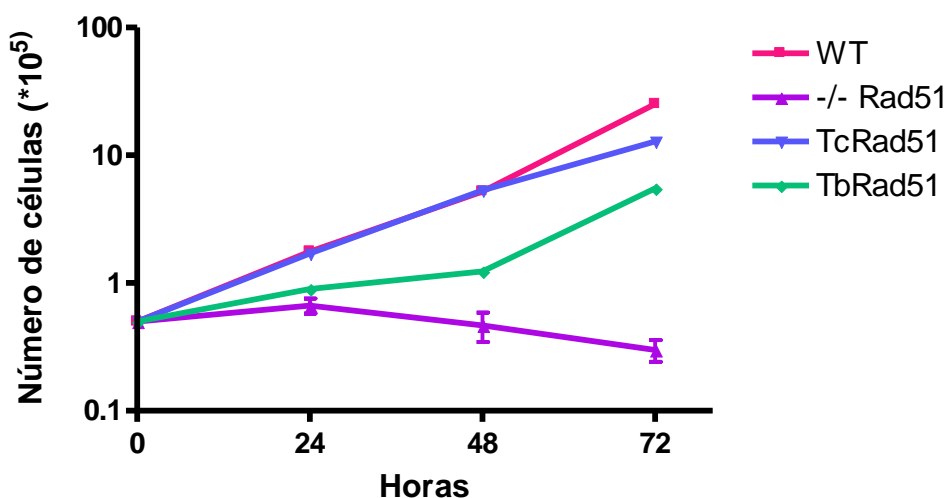
Dois ensaios foram usados para verificar as diferenças de sensibilidade aos danos de DNA causados pela fleomicina ou MMS. O primeiro ensaio foi uma curva de crescimento das células na ausência e presença de 0.04 µg/ml de fleomicina ou 0.0001% de MMS (Figuras 34A e B e 35A e B). O segundo ensaio foi analisar a sensibilidade aos agentes genotóxicos através da medição da absorção de alamar blue e o cálculo dos valores de IC50 (Concentração inibitória de 50% de viabilidade celular do inglês *Inhibition Concentration at 50%*) para cada linhagem celular (Figuras 34C e 35C).



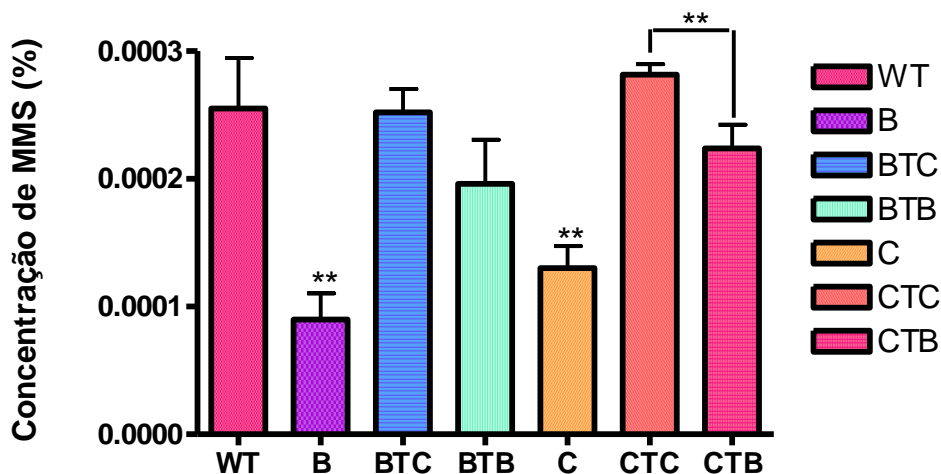


**Figura 34: Curva de crescimento e valores de IC50 de *T. brucei* selvagem (WT), nocaute para TbRad51 (-/- Rad51) expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) para o tratamento com fleomicina.** A) Curva de crescimento de parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (Clone B (-/+ Rad51) e expressando TcRad51 (Clone BTc (TcRad51)) ou TbRad51 (Clone BTb (TbRad51)) submetidos à 0,04µg.ml<sup>-1</sup> de fleomicina. B) Curva de crescimento de parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (Clone C (-/+ Rad51)) e expressando TcRad51 (Clone CTc (TcRad51)) ou TbRad51 (Clone CTb (TbRad51)) submetidos à 0,04µg.ml<sup>-1</sup> de fleomicina. Esses parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de 5x10<sup>4</sup> parasitos.ml<sup>-1</sup>. C) Gráfico dos valores de IC50 de parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (B e C) e expressando TcRad51 (BTC e CTC) ou TbRad51 (BTB e CTB) submetidos à fleomicina. Os valores mostrados correspondem à média de um experimento realizado em triplicata. Asteriscos indicam diferença significativa (\*\*: p<0.05 e \*\*\*: p<0.001) dos valores comparados com o parasito selvagem ou entre eles quando indicado por barras.

A)



B)



**Figura 35: Curva de crescimento e valores de IC50 de *T. brucei* selvagem (WT), nocaute para TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) para o tratamento com MMS.** A) Curva de crescimento de parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (Clone B (-/+ Rad51) e expressando TcRad51 (Clone BTc (TcRad51)) ou TbRad51 (Clone BTb (TbRad51)) submetidos à 0,0001% de MMS. Esses parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  parasitos.ml<sup>-1</sup>. B) Gráfico dos valores de IC50 de parasitos selvagens (WT), nocautes para TbRad51 (clones B e C) e expressando TcRad51 (clones BTC e CTC) ou TbRad51 (clones BTB e CTB) submetidos ao MMS. Os valores mostrados correspondem à média de um experimento realizado em triplicata. Asteriscos indicam diferença significativa (\*\*:  $p < 0.05$ ) dos valores comparados com o parasito selvagem ou entre eles quando indicado por barras.

Para as curvas de crescimento com fleomicina e MMS, dois clones de cada parasito nocaute (clones B e C) e re-expressores Rad51-/-/+ (clones BTb e CTb) e Rad51-/-/Tc (clones BTb e CTb) foram cultivadas por 72 h em triplicata (Figura 34A e B). Como mostrado em trabalhos anteriores, parasitos Rad51 nocautes apresentaram alta sensibilidade a fleomicina e mostraram uma considerável redução no número de parasitos após 72 horas ao tratamento quando comparados aos selvagens. Por outro lado, TcRad51 foi capaz de complementar o fenótipo de susceptibilidade a fleomicina apresentado pelos parasitos TbRad51 nocautes. Esses parasitos Rad51-/-/Tc (tanto clone BTC quanto o clone CTC) expressando TcRad51 apresentaram crescimento superior aos parasitos re-expressores Rad51-/-/+. O crescimento de Rad51-/-/Tc após o tratamento com fleomicina foi similar ao do parasito selvagem.

O ensaio de alamar blue foi outra abordagem adotada para verificar a complementação de TcRad51 em *T. brucei* nocautes para esse gene após tratamento com fleomicina. As células foram, então, cultivadas na presença de doze concentrações de fleomicina por 48 h em triplicata e a quantidade de células viáveis após esse período foi dosada pela metabolização de rezasurina. Após a detecção da absorbância, o IC50 dos parasitos foi calculado utilizando como referência os parasitos não tratados (Figura 34C). Os parasitos Rad51-/-/+ (clones BTb e CTb) apresentaram IC50 próximos aos parasitos Rad51-/- (clones B e C). Em contraste, os parasitos Rad51-/-/Tc (clones BTc e CTC) mostraram IC50 mais próximos aos parasitos selvagens mas intermediário entre esses e os parasitos Rad51-/-/+ (clones BTb e CTb). Esses resultados corroboram com a curva de crescimento obtida com esses parasitos, indicando

que Rad51-/-/Tc é mais resistente a fleomicina que os re-expressores Rad51-/-/+.

Resultados similares foram encontrados quando essas células foram submetidas ao MMS. As células selvagens e Rad51 -/-/Tc apresentaram curva de crescimento e IC50 similares após o tratamento com o MMS (Figura 35). O re-expressor Rad51-/-/+ (clone BTb) apresentou um perfil intermediário de curva de crescimento entre as células selvagens e Rad51-/-/. Em relação ao IC50, somente o IC50 do clone CTb dos parasitos Rad51-/-/+ mostrou IC50 menor que o clone CTC dos parasitos Rad51 -/-/Tc. Esses resultados indicam que as células Rad51-/-/Tc são mais resistentes a agentes que causam quebras duplas de DNA do que as células Rad51-/-/+.

#### **6.4. Análises de sensibilidade à cisplatina de linhagens *T. brucei* nocautes para Rad51 e complementadas com TcRad51 ou TbRad51**

Como demonstrado anteriormente, TcRad51 e TbRad51 não desempenham papéis centrais na resistência aos agentes envolvidos na geração de danos intra- ou inter- *crosslink* em *T. cruzi*. Da mesma forma, *T. brucei* re-expressores Rad51-/-/+ e Rad51-/-/Tc apresentaram o mesmo grau de resistência à cisplatina (Figura 36), indicando que a complementação tanto de TbRad51 quanto TcRad51 não afetou o reparo de *crosslinks* de DNA nesses organismos.

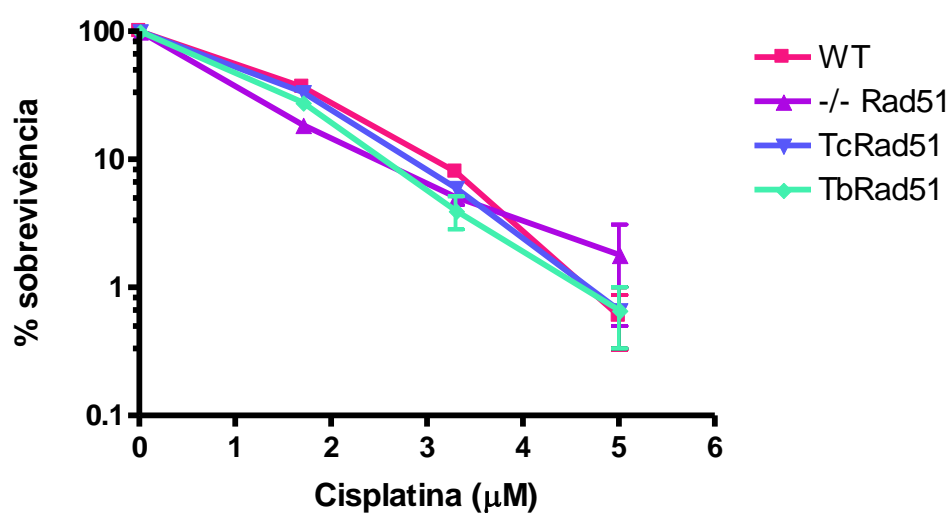
#### **6.5. Eficiência de recombinação em linhagens *T. brucei* nocautes para Rad51 e complementadas com TcRad51 ou TbRad51**

Uma vez que TcRad51 e TbRad51 apresentam diferenças no reparo de quebras duplas, foi verificado se essas proteínas também apresentam

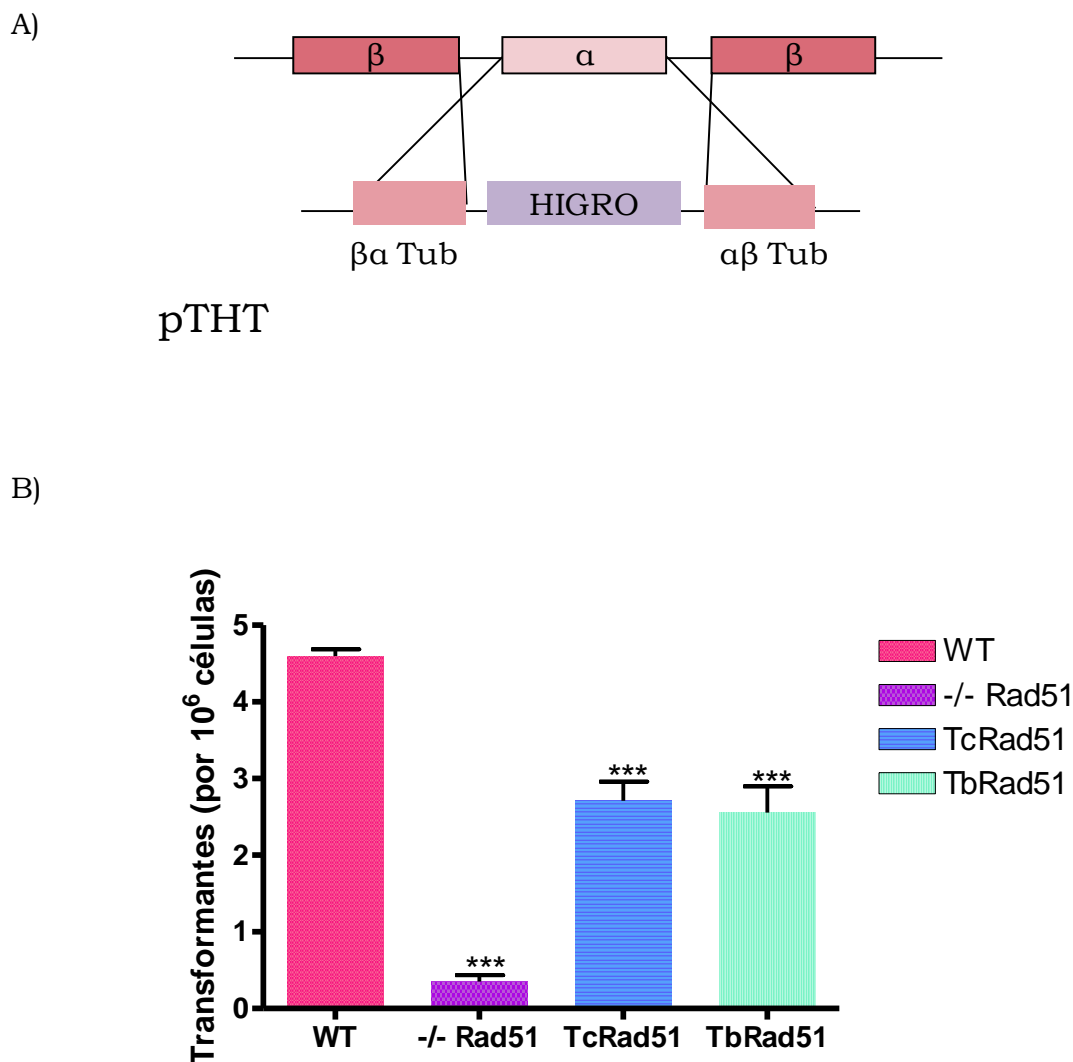
diferenças na eficiência da recombinação homóloga através da integração de DNA exógeno.

As células foram analisadas quanto à habilidade de realizar recombinação homóloga através de um teste de eficiência de transformação que mede a eficiência de integração de um vetor no genoma desses parasitos. Em *T. brucei*, os vetores são instáveis em forma episomal e quando linearizados são integrados no genoma por recombinação homóloga. Dessa forma, é possível traçar uma correlação entre o número de clones selecionados pelo antibiótico e a eficiência de recombinação. Vetores linearizados contendo em suas extremidades regiões intergênicas  $\beta\alpha$  e  $\alpha\beta$  tubulina e contendo um gene de resistência a higromicina foram transfectados nas diferentes linhagens celulares (Figura 37A). Caso a recombinação homóloga ocorra, essas regiões flangeadoras irão permitir a integração do vetor na região da tubulina tornando essas células resistentes a higromicina. A eficiência de transformação foi descrita como número de poços com crescimento de parasitos por  $10^6$  células plaqueadas.

A figura 37B mostra os resultados das análises e indicam que Rad51<sup>-/-</sup> apresentam uma diminuição na habilidade de transformação como mostrado anteriormente por McCulloch & Barry (1999). As linhagens Rad51<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> e Rad51<sup>-/-</sup>/Tc possuem eficiências similares que são valores intermediários entre as células selvagens e nocautes.



**Figura 36: Sobrevivência de *T. brucei* selvagem (WT), nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) tratados com cisplatina nas doses de 1,7, 3,3 e 5,0 µM.** Esses parasitos foram cultivados em meio HMI-9 em uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  parasitos.ml<sup>-1</sup>. Os valores mostrados correspondem à média percentual de triplicatas das células tratadas em relação às células não tratadas.



**Figura 37: Ensaio de eficiência de transformação de *T. brucei* selvagem (WT), nocaute de TbRad51 (-/- Rad51) e expressando TcRad51 (TcRad51) ou TbRad51 (TbRad51) para verificar a taxa de recombinação.** A) Vetor pTHT linearizado utilizado no ensaio de eficiência de transformação e a região de integração em tubulina. B) Valores indicados são a média do número de clones resistentes a higromicina por 10<sup>6</sup> células transformadas. Esse experimento foi realizado em triplicata com o mesmo DNA linearizado. As médias apresentadas correspondem a média de triplicatas de três experimentos.

## Discussão

A recombinação homóloga (HR) está envolvida na geração de variabilidade como também no reparo de lesões letais no DNA como quebras duplas de DNA. Algumas evidências sugerem que a recombinação homóloga é um mecanismo ativo em *T. cruzi*, pois esse parasito apresenta altos níveis de homozigose (MACHADO; AYALA, 2001; OLIVEIRA ET AL., 1998), uma característica não esperada para organismos assexuados (WELCH; MESELSON, 2000). Estudos sugerem que essa homogeneização do genoma da maioria das cepas de *T. cruzi* seja resultado da ação da recombinação mitótica e conversão gênica (MACHADO; AYALA, 2001). Trabalhos recentes têm sugerido que a HR é também responsável pela criação de genes mosaicos de moléculas de superfície através da conversão gênica segmentar e da duplicação de genes das famílias multigênicas que expressam proteínas de superfície (AZUAJE ET AL., 2007; BARTHOLOMEU ET AL., 2009; CERQUEIRA ET AL., 2008). A grande variedade de moléculas de superfície altamente polimórficas apresentadas pelo *T. cruzi* representa um arsenal útil contra o sistema imunológico do hospedeiro, através de ativações ineficientes de linfócitos B e T CD8+, levando ao atraso de uma resposta imune efetiva (TARLETON, 2007). Além disso, o *T. cruzi* é altamente resistente a doses elevadas de radiação gama (REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006; TAKEDA ET AL., 1986), um agente que causa quebras duplas no DNA direta ou indiretamente através de espécies reativas de oxigênio, cujo reparo ocorre através de HR.

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



Rad51 é a proteína chave no processo de recombinação. Algumas estratégias podem ser consideradas para estudar esse gene em *T. cruzi*, tais como, superexpressão, nocaute, entre outros. Inibição da expressão por RNAi não é um mecanismo viável em *T. cruzi* devido a ausência de vários componentes desse processo nesse parasito (DAROCHA; OTSU; ET AL., 2004). Portanto, foram escolhidas como estratégias para analisar o papel de Rad51 em *T. cruzi*: a superexpressão no parasito, a geração de heminocautes e complementação de TcRad51 em *T. brucei* nocautes para esse gene.

Vários estudos têm demonstrado o efeito da superexpressão de Rad51 em outros organismos, como por exemplo, o aumento da integração de DNA exógenos no genoma (VISPÉ ET AL., 1998; YÁÑEZ; PORTER, 1999), a instabilidade cromossômicas em células tumorais (ORRE ET AL., 2006; RICHARDSON ET AL., 2004) e a resistência a agentes que causam diversas lesões no DNA (RICHARDSON ET AL., 2004; SCHILD; WIESE, 2010; VISPÉ ET AL., 1998).

Para a geração de linhagens nocautes para Rad51, foi desenvolvido, inicialmente, um vetor para a deleção de um dos alelos de TcRad51. Amplificações e sequenciamento dos heminocautes utilizando iniciadores para o locus de Rad51 permitiram a confirmação da deleção do gene de um dos alelos de Rad51 (Figura 14 e 15). O parasito utilizado neste trabalho para a geração das linhagens heminocautes e superexpressora foi o clone CL Brener, derivado da cepa CL. O genoma desse clone foi sequenciado e caracteriza-se pela presença de um genoma híbrido, com altos níveis de heterozigose (EL-SAYED ET AL., 2005). Dessa forma, foi verificado que as regiões que flanqueiam Rad51 apresentam divergência de sequências entre os dois alelos. Portanto, para geração de nocautes de Rad51 nesse parasito, foi necessário o

desenvolvimento de vetores direcionados para cada um dos alelos contendo genes de resistência a antibióticos distintos. Essa estratégia foi realizada, mas, entretanto, não obtivemos sucesso na obtenção dos nocautes de Rad51 em *T. cruzi*. Algumas hipóteses podem explicar o insucesso na obtenção de parasitos nocautes: (1) a diminuição na concentração de Rad51 nos parasitos heminocautes dificulta a recombinação homóloga necessária para a deleção da segunda cópia, (2) apesar desse gene não ser essencial em *T. brucei* não podemos excluir a hipótese que Rad51 seja essencial em *T. cruzi*. Experimentos devem ser realizados com o objetivo de verificar se Rad51 é essencial em *T. cruzi* através da inserção de uma cópia de Rad51 em outro locus do genoma e realizar a deleção dos dois alelos endógenos. Outra estratégia é inserir um vetor de expressão de Rad51 indutível com tetraciclina, por exemplo.

Para avaliar o papel de Rad51 no reparo de quebras duplas em *T. cruzi*, avaliamos os parasitos selvagens, superexpressores e heminocautes de Rad51 quanto à concentração e a cinética de localização de Rad51 após a exposição à radiação gama (Figuras 18, 21 e 22). Epimastigotas selvagens apresentam uma indução da expressão da proteína TcRad51 após a radiação gama, como mostrado por *western blot* e pela quantificação da imunofluorescência (Figuras 18, 21 e 22). Esse resultado pode ser correlacionado com a indução da expressão do mRNA em células selvagens após esse tratamento como mostrado por Regis-da-Silva e colaboradores (2006). Os parasitos *L. major* também apresentam a indução do mRNA e da proteína Rad51 após o tratamento com fleomicina (MCKEAN ET AL., 2001), agente causador de quebras duplas, no entanto, essa indução não é observada em *T. brucei* (MCCULLOCH; BARRY, 1999). Além do aumento da abundância da proteína

TcRad51, a exposição à radiação gama também causa a formação de focos nucleares de TcRad51 logo após esse tratamento (Figura 21). As células superexpressoras apresentam níveis de fluorescência maiores que as células selvagens antes da exposição à radiação gama (Figura 22B) enquanto as células heminocautas apresentam um atraso no acúmulo de Rad51 no núcleo do parasito após a radiação gama (Figura 22). Portanto, diferentes níveis de Rad51 afetam a localização de Rad51 no núcleo, o qual é importante para o reparo de DSBs dado que foci de Rad51 são considerados locais de reparo de DSBs (GASIOR ET AL., 2001; HAAF ET AL., 1995; MLADENOV ET AL., 2006; RADERSCHALL ET AL., 1999; RODRIGUE ET AL., 2006). Estudos em leveduras e células de mamíferos indicam que foci de Rad51 são formados logo após a indução de DSBs (MIYAZAKI ET AL., 2004; RADERSCHALL ET AL., 1999), sendo o número de foci por núcleo correspondente ao número de DSBs induzidos (MIYAZAKI ET AL., 2004; RODRIGUE ET AL., 2006). Posteriormente, os foci de Rad51 podem se tornar mais intensos devido ao surgimento de regiões mais longas de ssDNA que permitem a formação de filamentos maiores de Rad51 (MIYAZAKI ET AL., 2004).

Uma maior concentração de TcRad51 antes da radiação parece ser suficiente para conferir às células superexpressoras uma maior resistência aos agentes que causam quebras duplas como radiação gama e zeocina. Os parasitos superexpressores retomam o crescimento antes dos selvagens após a radiação gama, e quando tratadas com zeocina apresentam maior taxa de sobrevivência (Figuras 10 e 11). A superexpressão de Rad51 em diferentes organismos e tipos celulares possui diferentes consequências, desde aumento na HR e resistência a agentes que causam danos no DNA até interrupção do ciclo celular e morte por apoptose (KLEIN, 2008). Além do aumento da

resistência à radiação gama, a superexpressão de Rad51 em células de mamíferos gera a formação de foci de Rad51 no núcleo mesmo sem indução de lesões no DNA (KLEIN, 2008; VISPÉ ET AL., 1998), como também visto para *T. cruzi*.

O atraso no acúmulo de TcRad51 no núcleo das células heminocutes se reflete em uma maior sensibilidade à radiação gama. Os parasitos heminocutes que possuem uma menor concentração de Rad51 no núcleo em vários pontos após a radiação, também apresentam demora na retomada do crescimento após a radiação (Figura 19). Portanto, a indução da expressão de TcRad51 e sua localização nuclear após a exposição à radiação gama, é prejudicada em heminocutes, e esta expressão alterada de TcRad51 determina uma recuperação menos eficiente do parasito frente a esse tratamento. Dessa forma, podemos concluir ser necessária a expressão dos dois alelos funcionais de Rad51 para uma resposta adequada à exposição à radiação gama em *T. cruzi*. A deleção do gene Rad51 também foi realizada em outros organismos como o parasito *T. brucei*, leveduras e células de mamífero. O nocaute dos dois alelos de Rad51 em *T. brucei* resultou em redução na taxa de crescimento, aumento da sensibilidade a agentes genotóxicos, além da diminuição da troca de VSGs (MCCULLOCH; BARRY, 1999). Em *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, o nocaute desse gene causa um aumento na sensibilidade à radiação gama e diminui fortemente a frequência de recombinação mitótica espontânea e induzida (MURIS ET AL., 1993; SAEKI ET AL., 1980; SHINOHARA ET AL., 1992; SHINOHARA; OGAWA, 1995). Por outro lado, o gene Rad51 é essencial para o desenvolvimento embrionário murino (LIM; HASTY, 1996; TSUZUKI ET AL., 1996) e células humanas deficientes em Rad51 apresentam parada na fase G2/M do ciclo celular e acumulam quebras

cromossômicas e eventualmente morrem (SONODA ET AL., 1998). Dado que as células de vertebrados possuem genomas centenas de vezes maiores do que as leveduras, DSBs espontâneas devem surgir mais frequentemente nessas células, explicando por que Rad51 é essencial para os vertebrados.

Com o objetivo de verificar se uma maior eficiência na cinética de recuperação dos parasitos superexpressando TcRad51 após a irradiação, corresponde a uma maior rapidez no reparo das quebras de fita dupla, foi realizado eletroforese em campo pulsátil (figura 12). Foi verificado que após a irradiação ocorre uma grande fragmentação do DNA em ambas as culturas, visualizado por um rastro de DNA de baixo peso molecular no gel. No entanto, 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 mais rapidamente do que nas células selvagens, uma vez que a fragmentação do DNA é reparada mais rapidamente nessas células. É possível inferir, uma vez que não houve um grande declínio no número de parasitos 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. Além do mecanismo de recombinação homóloga que pode ser iniciado por Rad51, o mecanismo NHEJ que não utiliza homologia de sequências para a recuperação, é uma segunda via que poderia recuperar as quebras de fita dupla. No entanto, alguns genes importantes dessa via não foram encontrados no genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED ET AL., 2005), sugerindo que provavelmente, como demonstrado em *T. brucei* (BURTON ET AL., 2007), esse

processo não ocorre no parasito ou esses genes sofreram grande divergência o que impossibilitou a sua identificação *in silico*.

A bactéria *Deinococcus radiodurans*, um organismo extremamente resistente à radiação ionizante, possui um perfil de crescimento após a irradiação bastante característico. Nessa 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 e heminocautes 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. Os níveis de Rad51 e a localização para o núcleo são induzidos logo após o tratamento, mas após 48 horas ocorre o declínio desses níveis e posteriormente, esses parasitos conseguem retomar o crescimento. Portanto, é possível que o parasito *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.

Os dados apresentados até o momento indicam que a recombinação homóloga e Rad51 possuem papel fundamental na alta resistência à radiação gama apresentado pelo *T. cruzi*, uma vez que variações nos níveis dessa proteína afetam a sensibilidade à radiação. Dessa forma, para avaliar diretamente a hipótese de que TcRad51 seria um dos fatores responsáveis por conferir ao parasito *T. cruzi* uma alta resistência à radiação gama, foi analisada a expressão deste gene em *T. brucei* nocaute para Rad51. Apesar de a recombinação possuir um papel central no *T. brucei* através da troca de VSGs que permite a sobrevivência desse parasito no hospedeiro, aparentemente ela não se apresenta tão ativa como em *T. cruzi* em relação ao reparo de quebras de fita dupla. O *T. brucei* é sensível a doses dez vezes menores que as utilizadas em *T. cruzi* e não há indução da expressão de Rad51 após a radiação nesse organismo (Figura 32).

Como publicado por McCulloch (1999), células nocautes para Rad51 apresentam uma diminuição na taxa de crescimento quando comparadas às células selvagens (Figura 33). A re-expressão de TbRad51 e a expressão de TcRad51 no *T. brucei* nocaute para Rad51, através da integração de vetores contendo esses genes no locus de tubulina, permitiu a restauração do fenótipo de crescimento das células selvagens. Esse resultado demonstrou que, mesmo com níveis de expressão diminuídos, como mostrado por *western blot*, TbRad51 complementou esse fenótipo (Figura 32). Por outro lado, TcRad51 também foi capaz de complementar os nocautes de TbRad51 quanto ao fenótipo de crescimento, indicando que mesmo com somente 66% de similaridade, essa proteína foi capaz de interagir com outras proteínas do *T.*

*brucei* e portanto, exercer a sua função (Figura 29). As proteínas Rad51 expressas nas células *Rad51-/-/+* e *Rad51-/-/Tc* são provenientes de uma cópia do vetor integrado, como mostrado na figura 31, no locus de tubulina e contém regiões intergênicas de actina e tubulina flanqueando a ORF de Rad51. Dessa forma, a menor expressão apresentada pelas células *Rad51-/-/+* se deve a presença de uma única cópia em comparação aos dois alelos nas células selvagens, além da presença de regiões não traduzidas distintas entre o Rad51 endógeno e a cópia presente no vetor. Além disso, dado que a região para a integração do vetor e as regiões não traduzidas para a correta expressão de Rad51 das células *Rad51-/-/+* são as mesmas àquelas utilizadas para a expressão de TcRad51 nos parasitos *Rad51-/-/Tc*, é provável que TcRad51 também possua uma expressão reduzida em comparação com a expressão de TbRad51 nos parasitos selvagens. No entanto, ensaios de *western blot* são necessário para se avaliar os níveis de expressão de TcRad51 nos parasitos *Rad51-/-/Tc* em comparação com os níveis de TbRad51 nos parasitos selvagens. Os anticorpos anti-TbRad51 utilizados neste trabalho não são capazes de reconhecer a proteína TcRad51. Portanto, a geração de anticorpos contra um peptídeo em comum de TcRad51 e TbRad51 seria uma das estratégias para tornar possível a comparação dos níveis protéicos de TcRad51 e TbRad51 nas diferentes linhagens através de *western blot* utilizando o mesmo anticorpo. Outra estratégia alternativa seria a realização de *western blots* contendo concentrações conhecidas de proteína purificada TcRad51 ou TbRad51 e utilizando anticorpos anti-TcRad51 ou anti-TbRad51, tornando possível a comparação dos níveis de TcRad51 e TbRad51 nas diferentes linhagens. Devido à falta de anticorpos anti-TcRad51, essa última estratégia ainda não foi realizada.



As células *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> e *Rad51*<sup>-/-</sup>/*Tc* também foram submetidas a ensaios com agentes que causam quebras duplas no DNA como o MMS e a fleomicina. Em ambos os tratamentos, os parasitos *Rad51*<sup>-/-</sup>/*Tc* apresentaram resistência superior aos parasitos *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> quando tratados com esses agentes (Figuras 34 e 35). Os valores obtidos para os parasitos *Rad51*<sup>-/-</sup>/*Tc* foram similares aos valores obtidos para os parasitos selvagens. Enquanto que os parasitos re-expressores *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> apresentaram resistência intermediária entre as células selvagens e nocautes para TbRad51 na maioria dos casos. Mais uma vez, essa maior sensibilidade dos parasitos *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> em relação às células selvagens, provavelmente se deve à menor expressão de Rad51 nos parasitos re-expressores *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> como mostrado por *western blot*.

As diferenças de sobrevivência encontradas entre os parasitos re-expressores *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> e *Rad51*<sup>-/-</sup>/*Tc* a agentes que causam quebras duplas no DNA podem ser explicadas por algumas hipóteses. Diferenças nos níveis de expressão entre TcRad51 e TbRad51 e na eficiência de atividade dessas proteínas podem ser responsáveis pelos fenótipos distintos dessas células. Outras possíveis explicações seriam diferenças na interação de TcRad51 e TbRad51 com outras proteínas do mecanismo de reparo de quebra dupla no *T. brucei* ou ainda, funções especializadas de cada uma dessas proteínas.

Apesar das regiões codificadoras dos genes TcRad51 e TbRad51 terem sido clonados no vetor pRM482, contendo as mesmas regiões não traduzidas que regulam a expressão gênica, a hipótese de que haja elementos regulatórios de expressão gênica dentro da ORF desses genes não pode ser excluída. Se isso ocorrer, pode-se pensar que elementos regulatórios presentes na região codificadora de TcRad51 poderiam influenciar sua expressão nas células de *T.*

*brucei*. Dessa forma, como dito anteriormente, é necessária a realização de experimentos para comparação dos níveis protéicos de TcRad51 e TbRad51 nesses parasitos para verificar se o motivo das diferenças nas taxas de sobrevivência se deve a uma expressão diferencial desses genes.

Experimentos para avaliar se existem diferenças de atividade enzimática das enzimas TcRad51 e TbRad51 também se fazem necessários. Estudos com a bactéria *Deinococcus radiodurans* indicam que um dos motivos da sua extrema resistência à radiação gama em relação a outras bactérias é a diferença de atividade enzimática de RecA (proteína ortóloga de Rad51 em procariotos) (KIM; COX, 2002). A proteína RecA de *E. coli*, e de outros organismos estudados até o momento, promove a formação de nucleofilamentos primeiramente na fita simples de DNA e esse invade a fita dupla homóloga. O motivo dessa sequência de eventos do mecanismo de HR é evitar a ligação de RecA em cromossomos que não estejam danificados. Dessa forma, RecA é direcionado para forquilhas de replicação bloqueadas ou extremidades livres de DNA processadas. Em contraste, o mecanismo de troca de fitas promovido pela proteína RecA de *D. radiodurans* ocorre exatamente de forma inversa, ela se liga inicialmente a fitas duplas de DNA. Essa característica parece ser um dos principais motivos que explicam a maior eficiência do sistema de reparo do dano desse organismo (KIM; COX, 2002). Dessa forma, a proteína RecA de *D. radiodurans* parece estar otimizada para promover um passo chave no reparo de DSBs. Além da diferença enzimática da proteína RecA, o mecanismo de HR de *D. radiodurans* possuem particularidades como uma extensa erosão exonucleolítica de fragmentos de DNA acompanhada de uma intensa síntese de DNA. As fitas simples geradas funcionam como iniciadores para alongamento de fragmentos sobrepostos e,

através do anelamento desses, é possível restabelecer a integridade cromossômica (SLADE ET AL., 2009). Recentemente, têm se discutido que a extraordinária resistência de *D. radiodurans* também é dependente de um eficiente mecanismo de proteção ao proteoma (KRISKO; RADMAN, 2010). A análise das atividades enzimáticas de TcRad51 e TbRad51 podem contribuir para o entendimento das diferenças da resistência à radiação gama apresentado por *T. cruzi* e *T. brucei*. Diferenças de afinidade por ssDNA e dsDNA, assim como, a rapidez na formação de produtos da troca de fitas são algumas das características enzimáticas de TcRad51 e TbRad51 que podem ser avaliadas *in vitro*.

A eficiência da HR é também dependente de outros mediadores da recombinação. Essas proteínas que auxiliam na correta localização de Rad51 e na efetivação de sua função podem ser encontrados em *T. cruzi* e *T. brucei* (BRCA2, parálogos de Rad51 e Rad54). Uma diferença evidente entre esses dois organismos em relação a esses mediadores é o número de repetições BRC da proteína BRCA2 (HARTLEY; MCCULLOCH, 2008). As repetições BRC são locais de interação com Rad51 e estimulam a formação de nucleofilamentos em ssDNA mas inibem em dsDNA, estimulando a recombinação (CARREIRA ET AL., 2009; SHIVJI ET AL., 2009; WONG ET AL., 1997). A proteína Brca2 de *T. cruzi* possui duas repetições BRC não idênticas enquanto que em *T. brucei* Brca2 possui uma expansão de BRC não usual em eucariotos unicelulares. A expansão das repetições em *T. brucei* é fundamental para eficiência do reparo de quebras duplas e para a correta localização de Rad51 (HARTLEY; MCCULLOCH, 2008). Uma das hipóteses para a expansão de BRC em *T. brucei* é a necessidade de um maior controle ou uma maior atividade da recombinação. Por exemplo, BRCA2 pode sequestrar um maior número de

Rad51, diminuindo o número de Rad51 livres, impedindo uma recombinação não controlada. Por outro lado, BRCA2 pode garantir uma maior disponibilidade de Rad51 no local de quebras duplas de DNA (HARTLEY; MCCULLOCH, 2008). Dessa forma, a interação de TcRad51 e TbRad51 com BRCA2 de *T. brucei* pode ocorrer de forma distinta, podendo levar a essas diferenças na resistência a agentes indutores de quebras duplas. Um dos experimentos sugeridos para verificar essa hipótese é uma imunoprecipitação de BRCA2 de *T. brucei* nos parasitos *Rad51-/-/+* e *Rad51-/-/Tc* com o objetivo de verificar os níveis de Rad51 interagindo com o BRCA2.

Holloman e colaboradores (2007) discutem que *Ustilago maydis*, um fungo também resistente a altas doses de radiação, não apresenta diferenças significativas na atividade enzimática de Rad51 quando comparado com *S. cerevisiae*. Um dos motivos que poderiam influenciar nas diferenças de resistência entre esses organismos é a presença da proteína BRCA2 em *U. maydis*, a qual não é encontrada em *S. cerevisiae*. Portanto, é provável que a resistência à radiação apresentada por esse fungo se deva a mudanças na ação de várias proteínas envolvidas no reparo. Além disso, essa maior resistência à radiação poderia ser uma consequência de uma maior abundância das proteínas envolvidas no reparo de DNA e não ser um reflexo da existência de um sistema de recombinação especializado como visto pra *D. radiodurans* (HOLLOMAN ET AL., 2008).

A variação antigênica está diretamente associada à recombinação homóloga, através da troca de VSGs. O nocaute de Rad51 causa uma drástica redução na troca de VSGs (MCCULLOCH; BARRY, 1999). Em contraste, células deficientes no MMR e Mre11 apresentam deficiência no mecanismo de HR, mas a variação antigênica não é afetada (BELL; MCCULLOCH, 2003;

ROBINSON ET AL., 2002). Portanto, TbRad51 parece ter uma importante função nesse mecanismo e pode ter se especializado para exercer essa função em *T. brucei*. Por outro lado, *T. cruzi* é extremamente resistente à radiação gama e, assim como *D. radiodurans*, pode ter sido adaptado ao reparo de quebras duplas no DNA. Dessa forma, para verificar se houve especialização de TbRad51 para a troca de VSGs, sugere-se a avaliação da frequência de troca de VSGs dos parasitos *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> e *Rad51*<sup>-/-</sup>/*Tc*. Esse experimento consiste na análise do número de clones que foram capazes de realizar a troca para uma VSG imunologicamente distinta permitindo assim a avaliação da taxa de troca de VSGs de cada linhagem. Análises de imunoprecipitação de cromatina (ChiP) de TcRad51 e TbRad51 nas linhagens *Rad51*<sup>-/-</sup>/<sup>+</sup> e *Rad51*<sup>-/-</sup>/*Tc* também podem fornecer informações se essas proteínas estão interagindo com as sequências *upstream* dos sítios de expressão ativa (repetições de 70pb) das VSGs, possíveis responsáveis pela homologia utilizada na troca de VSG por HR.

A recombinação homóloga é também o mecanismo através do qual ocorre a substituição estável de uma sequência cromossômica por uma exógena. Quando uma célula é transfectada, o plasmídeo é clivado por nucleases que produzem extremidades livres, simulando uma quebra de fita dupla (SMITH, 2001). Essas extremidades podem ser reconhecidas pela proteína Rad51 que inicia o processo de recombinação homóloga. Dessa forma, foi verificada a habilidade dos parasitos nocautes re-expressando TbRad51 e expressando TcRad51 de integrar o DNA exógeno no genoma através da quantificação da eficiência de transformação. Como publicado por Mcculloch & Barry (1999), os parasitos nocautes de Rad51 apresentam uma deficiência na integração de vetores quando comparado com os parasitos

selvagens, como representado pelo baixo número de clones resistentes a higromicina (Figura 37). Os parasitos *Rad51*<sup>-/-/+</sup> e *Rad51*<sup>-/-/Tc</sup> apresentam uma taxa de integração similar entre si, mas intermediária entre os parasitos selvagens e nocautes para *Rad51* (Figura 37). Os parasitos re-expressores *Rad51*<sup>-/-/+</sup> apresentam menor eficiência que as células selvagens provavelmente devido a menor concentração de proteína como mostrado por *western blot*. Por outro lado, TcRad51 foi capaz de complementar o nocaute de *Rad51* em *T. brucei* também com relação a integração de vetores no genoma desse parasito. No entanto, os parasitos *Rad51*<sup>-/-/Tc</sup> apresentam uma taxa de recombinação similar aos parasitos *Rad51*<sup>-/-/+</sup> e abaixo dos valores obtidos para parasitos selvagens. Esses dados contrastam com os dados de resistência a quebras duplas nos quais os parasitos *Rad51*<sup>-/-/Tc</sup> apresentam maior sobrevivência que os parasitos *Rad51*<sup>-/-/+</sup> (Figuras 34 e 35). Esses resultados sugerem que os níveis de TcRad51 e TbRad51 nas células *Rad51*<sup>-/-/Tc</sup> e *Rad51*<sup>-/-/+</sup>, respectivamente, seriam similares e por esse motivo essas células apresentam a mesma taxa de incorporação de DNA. Além disso, provavelmente o mecanismo de reparo de quebra dupla possui características distintas daquelas usadas para incorporação de DNA exógeno no genoma dos parasitos, como por exemplo, vias de sinalização distintas e diferenças no controle da HR. Portanto, TcRad51 participaria de forma distinta nesses dois mecanismos, através da interação com as proteínas de cada mecanismo.

Neste trabalho também foi avaliada a contribuição de TcRad51 para o reparo de outros tipos de lesões no DNA como *crosslinks* no DNA causados por agentes como a luz ultravioleta e cisplatina. Estudos recentes têm sugerido o envolvimento de recombinação no reparo de *crosslinks* no DNA que são capazes de bloquear a maquinaria de replicação em outros organismos

(ABOUSSEKHRA; AL-SHARIF, 2005; BHATTACHARYYA ET AL., 2000; LEGERSKI, 2010; WARD ET AL., 2007; YONETANI ET AL., 2005). Variações nos níveis de Rad51 não afetaram a sensibilidade de *T. cruzi* ou *T. brucei* à luz UV e ao tratamento com cisplatina (Figuras 23 e 27), indicando que Rad51 não desempenha um papel chave no reparo de lesões causadas por esses agentes genotóxicos nos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei*. A cisplatina e a luz UV causam distorções na hélice de DNA devido à formação de *crosslinks* no DNA. Essas lesões causam um bloqueio severo da transcrição, o que desencadeia a ativação do reparo acoplado à transcrição (LEGERSKI, 2010; LEHOCZKÝ ET AL., 2007). O reparo acoplado à transcrição (TCR) é uma sub-via do reparo por excisão de nucleotídeos, que realiza a remoção de lesões localizadas em genes ativos, tornando mais rápido o reparo dessas regiões (LEHOCZKÝ ET AL., 2007). Os tripanossomatídeos, como os parasitos *T. cruzi* e *T. brucei*, transcrevem a grande maioria de seu genoma em longos transcritos (MARTÍNEZ-CALVILLO ET AL., 2010). Dessa forma, lesões no DNA que causam a parada da maquinaria de transcrição seriam reparadas durante a transcrição através da TCR. Portanto, Rad51 não estaria envolvido no reparo destes tipos de danos ao DNA, explicando por que as superexpressoras e heminocautes para TcRad51 e o nocaute para TbRad51 não apresentaram diferença na sobrevivência a luz UV e cisplatina quando comparados aos parasitos selvagens. Outros estudos também sugerem que *T. cruzi* detecta e repara rapidamente lesões que causam distorções no DNA através do TCR. A superexpressão da DNA polimerase  $\epsilon$  de *T. cruzi*, envolvida na síntese translesão de dímeros de pirimidina, não confere qualquer proteção contra a luz UV ou cisplatina, indicando que provavelmente essas lesões não chegam a fase S onde a polimerase  $\epsilon$  seria necessária para a síntese translesão (MOURA ET AL., 2009). Além disso, resultados obtidos por nosso grupo

mostram que *T. cruzi* repara lesões induzidas por cisplatina em uma taxa extremamente alta, com remoção total das lesões em menos de uma hora (Rajão, dados não publicados). Dessa forma, devido à maioria do genoma ser transcrito constitutivamente, o TCR teria um papel chave no reparo de *crosslinks* de DNA, e essas lesões não chegariam à fase S onde seriam toleradas ou reparadas. No entanto, estudos envolvendo TCR são necessários para demonstrar esse papel em *T. cruzi*.

O *T. cruzi* possui um estágio intracelular e é, portanto, exposto a ROS que são gerados por diferentes mecanismos como seu próprio metabolismo aeróbico como também pela resposta imune do hospedeiro. Estudos recentes têm demonstrado a importância do mecanismo de recombinação no reparo de danos oxidativo no DNA em diversos organismos (HUANG; KOLODNER, 2005; LETAVAYOVÁ ET AL., 2006; SLUPPHAUG, 2003; STOHL; SEIFERT, 2006; SWANSON ET AL., 1999; TURNER ET AL., 2003). Para determinar o papel da Rad51 no reparo do dano oxidativo em *T. cruzi*, as células superexpressoras e heminocautes de TcRad51 foram tratados com peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante que causa danos ao DNA incluindo quebras de fita simples, perda de base e geração de 8oxoG (SLUPPHAUG, 2003). A superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência ao peróxido de hidrogênio, enquanto que a deleção de um alelo de TcRad51 diminui essa resistência (Figura 24). Similarmente, o nocaute de Rad51 em *T. brucei* também aumenta a sensibilidade desse organismo ao peróxido de hidrogênio (Figura 28). Dessa forma, os diferentes níveis de Rad51 na célula resultam em diferentes perfis de resistência a agentes oxidantes. Além disso, as formas amastigotas de *T. cruzi*, que estão sujeitas a constante resposta imune inata oxidativa do hospedeiro, apresentam maior expressão do mRNA



de TcRad51 que outros estágios, indicando um possível papel de TcRad51 no reparo do DNA de lesões oxidativas geradas pelo hospedeiro (REGIS-DA-SILVA ET AL., 2006).

A ativação de macrófagos do hospedeiro leva a geração de espécies reativas de oxigênio como também de óxido nítrico para controle da infecção aguda por *T. cruzi*. Dados recentes suportam a hipótese que parasitos mais preparados para lidar com o ataque oxidativo do hospedeiro são mais eficientes em estabelecer a doença de Chagas (FINZI, 2004). Dessa forma, o parasito possui um sistema complexo e efetivo para lidar com o estresse oxidativo, apesar da ausência de catalase e glutathiona redutase (PIACENZA ET AL., 2009). Quanto às lesões oxidativas ocorridas no DNA, as células possuem mecanismos de hidrólise de dNTPs oxidados e uma complexa rede de reparo de DNA. O reparo por excisão de base é a principal via envolvida no reparo de dano oxidativo à base de DNA. O TCR é uma das vias que parece estar envolvido no reparo dessas lesões em fitas transcritas. No entanto, vários estudos (como comentado por (PASTORIZA-GALLEGO ET AL., 2007)) relatam que uma das principais lesões produzidas pelo peróxido de hidrogênio, 8 oxoguanina, somente bloqueia a maquinaria transcricional no contexto de poucas sequências específicas de DNA que causam distorção da hélice. Dessa forma, as lesões oxidativas são reparadas através da via de reparo por excisão de base, e como a sinalização desta via é menos eficiente que a via TCR, algumas lesões e intermediários dessas que começaram a ser reparados chegam a fase S, quando eles podem bloquear a forquilha de replicação. A parada da forquilha de replicação pode ser um substrato para TcRad51, que poderia mediar a recombinação homóloga para reiniciar a forquilha de replicação (LI; HEYER, 2008; LUNDIN ET AL., 2003; WARD ET AL., 2007).

Em *S. cerevisiae*, foi descrito que as vias de reparo: BER, NER, TLS e HR possuem funções sobrepostas no reparo de danos oxidativos nas bases do DNA (SWANSON ET AL., 1999). Além disso, nesse mesmo organismo, o tratamento com água oxigenada ou a ausência de uma proteína antioxidante (a peroxiredoxina TSA1) resulta no aumento de foci de Rad52 (proteína chave da HR em leveduras), que são locais de recombinação e reparo de DSBs, predominantemente durante a fase S (HUANG; KOLODNER, 2005; RAGU ET AL., 2007; SOUZA-PINTO ET AL., 2009). A recombinação pode ser utilizada para contornar as lesões que causam a parada da maquinaria de replicação ou para restabelecer forquilhas de replicação colapsadas devido ao encontro de uma quebra de fita simples no DNA. Dessa forma, a recombinação pode se comportar como mecanismo de tolerância ao dano ao invés de um mecanismo de remoção de dano, dado que as bases danificadas continuam no genoma. Tal tolerância do dano mediada pela recombinação iria permitir a célula progredir na mitose, e o dano do DNA remanescente seria removido tardiamente por outras vias de reparo. (SWANSON ET AL., 1999). Dessa forma, a HR é um mecanismo chave na supressão de instabilidade genômica e morte celular induzida por estresse oxidativo. Parece provável, portanto, que TcRad51 e TbRad51 medeiam a resistência ao dano oxidativo ao DNA através do reparo ou tolerância de danos no DNA durante a replicação. Enzimas envolvidas em distintas vias de reparo como o sistema GO, BER, MMR e síntese translesão também parecem estar envolvidas no reparo de lesões oxidativas em *T. cruzi*. A superexpressão da enzima Ogg1 glicosilase, constituinte do sistema GO, e da polimerase beta, ambas envolvidas no BER, afetam a resistência ao tratamento com água oxigenada, além de diminuir os níveis de 8-oxoG do núcleo e do cinetoplasto do parasito após esse tratamento (FURTADO, 2009)(Schamber, resultados não publicados). Também

pertencente ao sistema GO, a enzima MutY de *T. cruzi* foi capaz de remover adenina frente a 8-oxoG *in vitro*, essa função evita a fixação de mutação no DNA. O gene MSH2 de *T. cruzi* também parece estar envolvido no reparo de lesões oxidativas. Linhagens de *T. brucei* deficientes em *msh2* apresentam um aumento na sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a complementação heteróloga com a proteína de *T. cruzi* foi capaz de reverter esse fenótipo (MACHADO-SILVA ET AL., 2008). Além disso, a deleção de um único alelo do TcMSH2 foi capaz de aumentar a sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e elevar os níveis de 8-oxoG no kDNA (Campos et al. submetido). Quanto à síntese translesão, a superexpressão das polimerases kappa e eta (TLS) conferem maior resistência à água oxigenada e essas polimerases são capazes de realizar a síntese de DNA frente a 8-oxoG (MOURA ET AL., 2009; RAJÃO ET AL., 2009). A sobreposição de vias de reparo na tolerância ou reparo de lesões oxidativas em *T. cruzi* pode ser correlacionado com a importância do reparo dessas lesões para a estratégia evolutiva desses parasitos quanto a sua sobrevivência dentro do hospedeiro.

Benzonidazol é um dos principais medicamentos para tratar a doença de Chagas. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dessa droga. Com o objetivo de elucidar o papel de TcRad51 no reparo das lesões geradas por essa droga, os parasitos superexpressores e heminocautes para Rad51 foram submetidos ao tratamento com diferentes concentrações desse composto. Foi verificado que parasitos superexpressores de TcRad51 são mais resistentes à essa droga do que os parasitos selvagens enquanto os parasitos heminocautes são mais sensíveis (Figura 25). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Goijman e colaboradores (1985) que descreveram um aumento da frequência de DSBs nos parasitos tratados com essa droga. Dessa forma, uma vez que TcRad51 parece contribuir com o

aumento da resistência aos efeitos do Benzonidazol, um estudo detalhado dessa enzima e das vias de reparo de DNA nas quais ela está envolvida poderá ser extremamente útil para o desenvolvimento de novas terapias mais eficientes do que o benzonidazol e para o conhecimento dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas atualmente. A comparação das sequências e da atividade de Rad51 presentes nas várias cepas de *T. cruzi*, as quais apresentam diferentes níveis de resistência a essas drogas, poderá fornecer subsídios importantes nessa direção.

Neste trabalho o papel de Rad51 na recombinação e no reparo de DNA de diferentes lesões foi avaliado em dois parasitos humanos: *T. cruzi* e *T. brucei*. A presença de diferentes níveis de Rad51 no parasito *T. cruzi* afeta a localização dessa proteína no núcleo, o reparo de DSBs e, conseqüentemente, a recuperação desse parasito após a radiação gama. Quanto ao reparo de outras lesões, as evidências indicam que TcRad51 e TbRad51 não possuem papéis preponderantes no reparo de *crosslinks* de DNA, mas estão envolvidos no reparo de lesões oxidativas no DNA desses parasitos. Além disso, a comparação das proteínas TcRad51 e TbRad51 revelou que, apesar dessas proteínas proporcionarem a mesma taxa de recombinação para o *T. brucei*, a expressão de TcRad51 confere uma maior resistência a agentes que causam DSBs do que a proteína TbRad51. Experimentos de co-imunoprecipitação de TcRad51 e TbRad51 seriam de grande interesse para avaliar se há diferenças nas proteínas que interagem com TcRad51 ou TbRad51. Além disso, análises de modificações pós-traducionais de TcRad51 seriam interessantes para caracterizar as modificações em resposta ao dano, como por exemplo, avaliar os sinais para a localização nuclear após o tratamento com radiação gama e

verificar se há sinais de direcionamento para o proteassomo para a reciclagem de Rad51 após o reparo. Outro experimento interessante seria a análise da eficiência de reparo de diferentes lesões no DNA das linhagens desenvolvidas neste trabalho, através de PCR quantitativo que mede a quantidade de danos no DNA. Finalmente, análises avaliando a infecção das linhagens utilizadas neste trabalho também são de grande importância para analisar o papel da proteína TcRad51 no processo de infecção e na progressão da doença de Chagas.

## **Bibliografia**

## **Anexo 1: Plasmídeos**

## **Anexo 2: Artigos**



## Bibliografia

ABOUSSEKHRA, A.; AL-SHARIF, I. S. Homologous recombination is involved in transcription-coupled repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 24, n. 11, p. 1999-2010. doi: 10.1038/sj.emboj.7600665, 2005.

AUGUSTO-PINTO, L.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D.; MACHADO, C. R. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 272, n. 1-2, p. 323-33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470539>, 2001.

AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D.; MACHADO, C. R. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**, v. 164, n. 1, p. 117-26. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 2003.

AZUAJE, F. J.; RAMIREZ, J. L.; DA SILVEIRA, J. F. In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 6, p. 6. doi: 10.1186/1475-9292-6-6, 2007.

BARLOW, J. H.; ROTHSTEIN, R. Timing is everything: cell cycle control of Rad52. **Cell division**, v. 5, p. 7. doi: 10.1186/1747-1028-5-7, 2010.

BARNES, R. L.; MCCULLOCH, R. *Trypanosoma brucei* homologous recombination is dependent on substrate length and homology, though displays a differential dependence on mismatch repair as substrate length decreases. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 10, p. 3478-93. doi: 10.1093/nar/gkm249, 2007.

BARTHOLOMEU, D. C.; CERQUEIRA, G. C.; LEA, A. C.; ET AL. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein ( masp ) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, p. 1-11. doi: 10.1093/nar/gkp172, 2009.

BELL, J. S.; MCCULLOCH, R. Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in *Trypanosoma brucei*. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45182-8. doi: 10.1074/jbc.M308123200, 2003.

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation research**, v. 231, n. 1, p. 11-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2195323>, 1990.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; ET AL. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 416-22. doi: 10.1126/science.1112642, 2005.

BHATTACHARYYA, A.; EAR, U. S.; KOLLER, B. H.; WEICHSELBAUM, R. R.; BISHOP, D. K. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23899-903. doi: 10.1074/jbc.C000276200, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>, 1976.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 111, n. 1, p. 95-105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087920>, 2000.

BURTON, P.; MCBRIDE, D. J.; WILKES, J. M.; BARRY, J. D.; MCCULLOCH, R. Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 10, p. 1773-81. doi: 10.1128/EC.00212-07, 2007.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 5, p. 419-27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737998>, 2003.

CALDECOTT, K. W. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 23, n. 5, p. 447-55. doi: 10.1002/bies.1063, 2001.

CAMARGO, E. P. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14177814>, 1964.

CARRASCO, H. J.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 4, p. 418-24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615458>, 1996.

CARREIRA, A.; HILARIO, J.; AMITANI, I.; ET AL. The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 1032-43. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.019, 2009.

CERQUEIRA, G. C.; BARTHOLOMEU, D. C.; DAROCHA, W. D.; ET AL. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 157, n. 1, p. 65-72. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.10.002, 2008.

CHANET, R.; HEUDE, M.; ADJIRI, A.; MALOISEL, L.; FABRE, F. Semidominant mutations in the yeast Rad51 protein and their relationships with the Srs2 helicase. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 9, p. 4782-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1996.

CHURCH, G. M.; GILBERT, W. Genomic sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 7, p. 1991-5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=345422&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1984.

CONWAY, C.; MCCULLOCH, R.; GINGER, M. L.; ET AL. Ku is important for telomere maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes, in African trypanosomes. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21269-77. doi: 10.1074/jbc.M200550200, 2002.

CONWAY, C.; PROUDFOOT, C.; BURTON, P.; BARRY, J. D.; MCCULLOCH, R. Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. **Molecular microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1687-700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354234>, 2002.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=338945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1988.

CROSS, G. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 393-417. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, 1975.

DABOUSSI, F.; DUMAY, A.; DELACÔTE, F.; LOPEZ, B. S. DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. **Cellular signalling**, v. 14, n. 12, p. 969-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359302>, 2002.

DAROCHA, W. D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S. M.; DONELSON, J. E. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 133, n. 2, p. 175-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698430>, 2004.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; ET AL. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology research**, v. 92, n. 2, p. 113-20. doi: 10.1007/s00436-003-1004-5, 2004.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; ET AL. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 3, p. e24. doi: 10.1371/journal.ppat.0020024, 2006.

DE FREITAS JM. Mapeamento cromossômico de marcadores moleculares e de genes envolvidos no reparo de DNA em *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Minas Gerais, 2003

DOBSON, R. P. Analysis of the functions and interactions of the RAD51 paralogues in *Trypanosoma brucei*. **Thesis**, 2009.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; ET AL. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409-15. doi: 10.1126/science.1112631, 2005.

ENGMAN, D. M.; REDDY, L. V.; DONELSON, J. E.; KIRCHHOFF, L. V. Trypanosoma cruzi exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 22, n. 2-3, p. 115-23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553931>, 1987.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521921>, 1998.

FINZI, J. Trypanosoma cruzi response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 37-43. doi: 10.1016/j.molbiopara.2003.08.011, 2004.

FORGET, A. L.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. **Trends in cell biology**, v. 20, n. 5, p. 269-76. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tcb.2010.02.004, 2010.

FURTADO. Reparo de DNA em dois patógenos humanos: Caracterização do gene IMP4 de Schistosoma mansoni e Estudos acerca do MMR, Sistema GO e taxa de mutação em Trypanosoma cruzi. **Gene**, 2009.

GALLEGO, C.; ESTÉVEZ, A. M.; FÁREZ, E.; RUIZ-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. Overexpression of AP endonuclease protects Leishmania major cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 141, n. 2, p. 191-7. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.03.002, 2005.

GASIOR, S. L.; OLIVARES, H.; EAR, U.; ET AL. Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8411-8. doi: 10.1073/pnas.121046198, 2001.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, I. A.; ET AL. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936-9. doi: 10.1038/nature01438, 2003.

GEOGHEGAN, D. S.; SKINNER-ADAMS, T.; DAVIS, T. M. Plasmodium falciparum: isolate-specific radiosensitivity. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 2, p. 108-10. doi: 10.1006/expr.2001.4649, 2001.

GOMES, M. L.; ARAUJO, S. M.; CHIARI, E. Trypanosoma cruzi: growth of clones on solid medium using culture and blood forms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 131-2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1842394>, 1991.

GOLJMAN, S. G.; FRASCH, A. C.; STOPPANI, A. O. Damage of Trypanosoma cruzi deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. **Biochemical pharmacology**, v. 34, n. 9, p. 1457-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888226>, 1985.

HAAF, T.; GOLUB, E. I.; REDDY, G.; RADDING, C. M.; WARD, D. C. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2298-302. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1995.

HAKEM, R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **The EMBO journal**, v. 27, n. 4, p. 589-605. doi: 10.1038/emboj.2008.15, 2008.

HANAHAHAN, D.; MESELSON, M. Plasmid screening at high colony density. **Methods in enzymology**, v. 100, p. 333-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6194407>, 1983.

HARTLEY, C. L.; MCCULLOCH, R. Trypanosoma brucei BRCA2 acts in antigenic variation and has undergone a recent expansion in BRC repeat number that is important during homologous recombination. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1237-51. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06230.x, 2008.

HIRUMI, H.; HIRUMI, K. Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 10, n. 2, p. 80-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275508>, 1994.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p. 366-374, 2001.

HOLLOMAN, W. K.; SCHIRAWSKI, J.; HOLLIDAY, R. The homologous recombination system of Ustilago maydis. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 45 Suppl 1, p. S31-9. doi: 10.1016/j.fgb.2008.04.006, 2008.

[HTTP://WWW.GENEDB.ORG](http://WWW.GENEDB.ORG), G. GeneDB. Retrieved from <http://www.genedb.org/Homepage>.

HUANG, M.; KOLODNER, R. D. A Biological Network in Saccharomyces cerevisiae Prevents the Deleterious Effects of Endogenous Oxidative DNA Damage. **Mol ecularCell**, v. 17, p. 709-720. doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.008, 2005.

HUERTAS, P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 1, p. 11-6. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nsmb.1710, 2010.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; ET AL. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436-42. doi: 10.1126/science.1112680, 2005.

JACKSON, A. P. Origins of amino acid transporter loci in trypanosomatid parasites. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 26. doi: 10.1186/1471-2148-7-26, 2007.

JIANG, C. Z.; YEN, C. N.; CRONIN, K.; MITCHELL, D.; BRITT, A. B. UV- and gamma-radiation sensitive mutants of Arabidopsis thaliana. **Genetics**, v. 147, n. 3, p. 1401-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1208261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1997.

KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected tropical diseases: infection, modeling, and control. **Journal of health care for the poor and underserved**, v. 21, n. 1, p. 53-69. doi: 10.1353/hpu.0.0270, 2010.

KELLY, J.; LAW, J.; CHAPMAN, C.; VAN EYS, G.; EVANS, D. Evidence of genetic recombination in Leishmania. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 46, n. 2, p. 253-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 1991.

KESZENMAN, D. J.; SALVO, V. A.; NUNES, E. Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of Saccharomyces cerevisiae: a model of repair pathways. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 10, p. 3125-32. Retrieved

from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1992.

KIM, J.; COX, M. M. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 7917-21. doi: 10.1073/pnas.122218499, 2002.

KLEIN, H. L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. **DNA repair**, v. 7, n. 5, p. 686-93. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.12.008, 2008.

KLINGBEIL, M. M.; MOTYKA, S. A.; ENGLUND, P. T. Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. **Molecular cell**, v. 10, n. 1, p. 175-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150917>, 2002.

KRISKO, A.; RADMAN, M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. **PNAS**, v. 107, n. 32, p. 14373-14377. doi: 10.1073/pnas.1009312107, 2010.

LEGERSKI, R. J. Review Article Repair of DNA Interstrand Cross-links During S Phase of the Mammalian Cell Cycle. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, p. 540-551. doi: 10.1002/em, 2010.

LEHMANN, A. R.; NIIMI, A.; OGI, T.; ET AL. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. **DNA repair**, v. 6, n. 7, p. 891-9. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.003, 2007.

LEHOCZKÝ, P.; MCHUGH, P. J.; CHOVANEC, M. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 2, p. 109-33. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00046.x, 2007.

LETAVAYOVÁ, L.; MARKOVÁ, E.; HERMANSKÁ, K.; ET AL. Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA repair**, v. 5, n. 5, p. 602-10. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.01.004, 2006.

LI, X.; HEYER, W. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. **Cell research**, v. 18, n. 1, p. 99-113. doi: 10.1038/cr.2008.1, 2008.

LIM, D. S.; HASTY, P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 12, p. 7133-43. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1996.

LIU, Y.; ZHOU, J.; OMELCHENKO, M. V.; ET AL. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 4191-6. doi: 10.1073/pnas.0630387100, 2003.

LOPES, D. D.; SCHAMBER-REIS, B. L.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; ET AL. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA repair**, v. 7, n. 11, p. 1882-92. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.07.018, 2008.

LUNDIN, C.; NORTH, M.; ERIXON, K.; ET AL. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 12, p. 3799-811. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 2005.

LUNDIN, C.; SCHULTZ, N.; ARNAUDEAU, C.; ET AL. RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, n. 3, p. 521-535. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00313-9, 2003.

MACHADO, C. A.; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7396-401. doi: 10.1073/pnas.121187198, 2001.

MACHADO, C. R.; AUGUSTO-PINTO, L.; MCCULLOCH, R.; TEIXEIRA, S. M. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. **Mutation research**, v. 612, n. 1, p. 40-57. doi: 10.1016/j.mrrev.2005.05.001, 2006.

MACHADO-SILVA, A.; TEIXEIRA, S. M.; FRANCO, G. R.; ET AL. Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. **Gene**, v. 411, n. 1-2, p. 19-26. doi: 10.1016/j.gene.2007.12.021, 2008.

MARNETT, L. J.; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends in genetics : TIG**, v. 17, n. 4, p. 214-21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11275327>, 2001.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 525241. doi: 10.1155/2010/525241, 2010.

MAZIN, A. V.; MAZINA, O. M.; BUGREEV, D. V.; ROSSI, M. J. Rad54, the motor of homologous recombination. **DNA repair**, v. 9, n. 3, p. 286-302. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.12.006, 2010.

MCCULLOCH, R.; BARRY, J. D. A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. **Genes & development**, v. 13, n. 21, p. 2875-88. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1999.

MCCULLOCH, R.; HORN, D. What has DNA sequencing revealed about the VSG expression sites of African trypanosomes? **Trends in parasitology**, v. 25, n. 8, p. 359-63. doi: 10.1016/j.pt.2009.05.007, 2009.

MCKEAN, P. G.; KEEN, J. K.; SMITH, D. F.; BENSON, F. E. Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 115, n. 2, p. 209-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420107>, 2001.

MERCIER, G.; DENIS, Y.; MARC, P.; PICARD, L.; DUTREIX, M. Transcriptional induction of repair genes during slowing of replication in irradiated *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation research**, v. 487, n. 3-4, p. 157-72, 2001.

MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/407674>, 1977.

MIYAZAKI, T.; BRESSAN, D. A.; SHINOHARA, M.; HABER, J. E.; SHINOHARA, A. In vivo assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. **The EMBO journal**, v. 23, n. 4, p. 939-49. doi: 10.1038/sj.emboj.7600091, 2004.

MLADENOV, E.; ANACHKOVA, B.; TSANEVA, I. Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. **Genes to Cells**, v. 11, p. 513-524. doi: 10.1111/j.1365-2443.2006.00958.x, 2006.

MOURA, M. B.; SCHAMBER-REIS, B. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; ET AL. Cloning and Characterization of DNA Polymerase eta from *Trypanosoma cruzi* : Roles for Translesion Bypass of Oxidative Damage. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, n. 5, p. 375-86. doi: 10.1002/em, 2009.

MOYNAHAN, M. E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 3, p. 196-207. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrm2851, 2010.

MURIS, D. F.; VREEKEN, K.; CARR, A. M.; ET AL. Cloning the RAD51 homologue of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 19, p. 4586-91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1993.

NOUSPIKEL, T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 6, p. 994-1009. doi: 10.1007/s00018-009-8737-y, 2009.

OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M.; ET AL. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3776-80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1998.

ORRE, L. M.; FÄLT, S.; SZELES, A.; ET AL. Rad51-related changes in global gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 341, n. 2, p. 334-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.185, 2006.

PASTORIZA-GALLEGO, M.; ARMIER, J.; SARASIN, A. Transcription through 8-oxoguanine in DNA repair-proficient and Csb(-)/Ogg1(-) DNA repair-deficient mouse embryonic fibroblasts is dependent upon promoter strength and sequence context. **Mutagenesis**, v. 22, n. 5, p. 343-51. doi: 10.1093/mutage/gem024, 2007.

PIACENZA, L.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; RADI, R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 4, p. 415-21. doi: 10.1016/j.mib.2009.06.011, 2009.



PLUSKOTA-KARWATKA, D. Modifications of nucleosides by endogenous mutagens-DNA adducts arising from cellular processes. **Bioorganic chemistry**, v. 36, n. 4, p. 198-213. doi: 10.1016/j.bioorg.2008.04.002, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2, 2001.

PROUDFOOT, C.; MCCULLOCH, R. Distinct roles for two RAD51-related genes in Trypanosoma brucei antigenic variation. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 21, p. 6906-19. doi: 10.1093/nar/gki996, 2005.

PROUDFOOT, C.; MCCULLOCH, R. Trypanosoma brucei DMC1 does not act in DNA recombination, repair or antigenic variation in bloodstream stage cells. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 145, n. 2, p. 245-53. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.10.007, 2006.

PÉREZ, J.; GALLEGO, C.; BERNIER-VILLAMOR, V.; ET AL. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae leishmania major and Trypanosoma cruzi confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient Escherichia coli. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 3, p. 771-7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148246&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1999.

RADERSCHALL, E.; GOLUB, E. I.; HAAF, T. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 1921-6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1999.

RAGU, S.; FAYE, G.; IRAQUI, I.; ET AL. Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 23, p. 9747-52. doi: 10.1073/pnas.0703192104, 2007.

RAJÃO, M. A.; PASSOS-SILVA, D. G.; DAROCHA, W. D.; ET AL. DNA polymerase kappa from Trypanosoma cruzi localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. **Molecular microbiology**, v. 71, n. 1, p. 185-97. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06521.x, 2009.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X, 2010.

REGIS-DA-SILVA, C. G.; FREITAS, J. M.; PASSOS-SILVA, D. G.; ET AL. Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 149, n. 2, p. 191-200. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.05.012, 2006.

RICHARDSON, C.; STARK, J. M.; OMMUNDSEN, M.; JASIN, M. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. **Oncogene**, v. 23, n. 2, p. 546-53. doi: 10.1038/sj.onc.1207098, 2004.

RICHARDSON, C.; STARK, J. M.; OMMUNDSEN, M.; JASIN, M. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. **Oncogene**, v. 23, n. 2, p. 546-53. doi: 10.1038/sj.onc.1207098, 2004.

RIJKERS, T.; VAN DEN OUWELAND, J.; MOROLLI, B.; ET AL. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 11, p. 6423-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109228&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1998.

ROBELLO, C.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; ALVAREZ-VALIN, F. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. **Gene**, v. 246, n. 1-2, p. 331-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767555>, 2000.

ROBERTSON, A. B.; KLUNGLAND, A.; ROGNES, T.; LEIROS, I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 6, p. 981-93. doi: 10.1007/s00018-009-8736-z, 2009.

ROBINSON, N. P.; MCCULLOCH, R.; CONWAY, C.; BROWITT, A.; BARRY, J. D. Inactivation of Mre11 does not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26185-93. doi: 10.1074/jbc.M203205200, 2002.

ROCA, A. I.; COX, M. M. The RecA protein: structure and function. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 25, n. 6, p. 415-56. doi: 10.3109/10409239009090617, 1990.

RODRIGUE, A.; LAFRANCE, M.; GAUTHIER, M.; ET AL. Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. **The EMBO journal**, v. 25, n. 1, p. 222-31. doi: 10.1038/sj.emboj.7600914, 2006.

SAEKI, T.; MACHIDA, I.; NAKAI, S. Genetic control of diploid recovery after gamma-irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation research**, v. 73, n. 2, p. 251-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7007877>, 1980.

SAGE, J. M.; GILDEMEISTER, O. S.; KNIGHT, K. L. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 25, p. 18984-90. doi: 10.1074/jbc.M109.099846, 2010.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 229-57. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255, 2008.

SANCAR, A. Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32153-7. doi: 10.1074/jbc.R800052200, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-7. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=431765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1977.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATS T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. **Cold spring harbor laboratory press**, 2nd edition., 1987

SAXOWSKY, T. T.; CHOUDHARY, G.; KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND, P. T. Trypanosoma brucei has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 49, p. 49095-101. doi: 10.1074/jbc.M308565200, 2003.

SCHILD, D.; WIESE, C. Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 4, p. 1061-70. doi: 10.1093/nar/gkp1063, 2010.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl , p. 75-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891282>, 2007.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 579-608. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090847, 2003.

SCHÖN, I.; MARTENS, K. No slave to sex. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1517, p. 827-33. doi: 10.1098/rspb.2002.2314, 2003.

SHINOHARA, A.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. **Cell**, v. 69, n. 3, p. 457-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1581961>, 1992.

SHINOHARA, A.; OGAWA, T. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 10, p. 387-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533149>, 1995.

SHIVJI, M. K.; MUKUND, S. R.; RAJENDRA, E.; ET AL. The BRC repeats of human BRCA2 differentially regulate RAD51 binding on single-versus double-stranded DNA to stimulate strand exchange. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 32, p. 13254-9. doi: 10.1073/pnas.0906208106, 2009.

SLADE, D.; LINDNER, A. B.; PAUL, G.; RADMAN, M. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 1044-55. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.018, 2009.

SLUPPHAUG, G. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1-2, p. 231-251. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002, 2003.

SMITH, K. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 6, p. 465-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126294>, 2001.

SONODA, E.; SASAKI, M. S.; BUERSTEDDE, J. M.; ET AL. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. **The EMBO journal**, v. 17, n. 2, p. 598-608. doi: 10.1093/emboj/17.2.598, 1998.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 83, n. 2, p. 141-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027747>, 1996.

SOUZA-PINTO, N. C.; MAYNARD, S.; HASHIGUCHI, K.; ET AL. The Recombination Protein RAD52 Cooperates with the Excision Repair Protein OGG1 for the Repair of Oxidative Lesions in Mammalian Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 16, p. 4441-4454. doi: 10.1128/MCB.00265-09, 2009.

STOCKDALE, C.; SWIDERSKI, M. R.; BARRY, J. D.; MCCULLOCH, R. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs. **PLoS biology**, v. 6, n. 7, p. e185. doi: 10.1371/journal.pbio.0060185, 2008.

STOHL, E. A.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7645-51. doi: 10.1128/JB.00801-06, 2006.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of molecular biology**, v. 189, n. 1, p. 113-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3537305>, 1986.

SUNG, P.; KREJCI, L.; VAN KOMEN, S.; SEHORN, M. G. Rad51 recombinase and recombination mediators. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 44, p. 42729-32. doi: 10.1074/jbc.R300027200, 2003.

SUNG, P.; STRATTON, S. A. Yeast Rad51 recombinase mediates polar DNA strand exchange in the absence of ATP hydrolysis. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 45, p. 27983-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910403>, 1996.

SWANSON, R. L.; MOREY, N. J.; DOETSCH, P. W.; JINKS-ROBERTSON, S. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 4, p. 2929-35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84087&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1999.

SYMINGTON, L. S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 4, p. 630-70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 2002.

TAIT, A. Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. **Nature**, v. 287, n. 5782, p. 536-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7422004>, 1980.

TAKEDA, G. K.; CAMPOS, R.; KIEFFER, J.; ET AL. [Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice].

**Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 15-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3094131>, 1986.

TAN, K. S.; LEAL, S. T.; CROSS, G. A. Trypanosoma brucei MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 11-21, 2002.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 4, p. 430-4. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.003, 2007.

TEIXEIRA, S. M.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, n. 1, p. 148-58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917811>, 2003.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=322802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1986.

TSUZUKI, T.; FUJII, Y.; SAKUMI, K.; ET AL. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6236-40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1996.

TURNER, D. R.; DREIMANIS, M.; HOLT, D.; FIRGAIRA, F. A.; MORLEY, A. A. Mitotic recombination is an important mutational event following oxidative damage. **Mutation research**, v. 522, n. 1-2, p. 21-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517408>, 2003.

VAN VEELLEN, L. R.; ESSERS, J.; VAN DE RAKT, M. W.; ET AL. Ionizing radiation-induced foci formation of mammalian Rad51 and Rad54 depends on the Rad51 paralogs, but not on Rad52. **Mutation research**, v. 574, n. 1-2, p. 34-49. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.020, 2005.

VENEGAS, J. A.; ASLUND, L.; SOLARI, A. Cloning and characterization of a DNA polymerase beta gene from Trypanosoma cruzi. **Parasitology international**, v. 58, n. 2, p. 187-92. doi: 10.1016/j.parint.2009.01.007, 2009.

VIDAL, A. E.; HARKIOLAKI, M.; GALLEGGO, C.; ET AL. Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from Leishmania major. **Journal of molecular biology**, v. 373, n. 4, p. 827-38. doi: 10.1016/j.jmb.2007.08.001, 2007.

VISPÉ, S.; CAZAUX, C.; LESCA, C.; DEFAIS, M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. **Nucleic acids research**, v. 26, n. 12, p. 2859-64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1998.

WARD, J. D.; BARBER, L. J.; PETALCORIN, M. I.; YANOWITZ, J.; BOULTON, S. J. Replication blocking lesions present a unique substrate for homologous recombination. **The EMBO journal**, v. 26, n. 14, p. 3384-96. doi: 10.1038/sj.emboj.7601766, 2007.

WELCH, D. M.; MESELSON, M. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5469, p. 1211-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817991>, 2000.

WHO. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). . World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, 2010.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 11, p. e31. doi: 10.1017/S1462399409001252, 2009.

WILLIAMS, B.; LUSTIG, A. J. The paradoxical relationship between NHEJ and telomeric fusion. **Molecular cell**, v. 11, n. 5, p. 1125-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769837>, 2003.

WONG, A. K.; PERO, R.; ORMONDE, P. A.; TAVTIGIAN, S. V.; BARTEL, P. L. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 51, p. 31941-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405383>, 1997.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. **Chem Res Toxicol**, v. 19, n. 12, p. 1580-94. doi: 17173371, 2006.

XIA, S. J.; SHAMMAS, M. A.; SHMOOKLER REIS, R. J. Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 12, p. 7151-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, 1997.

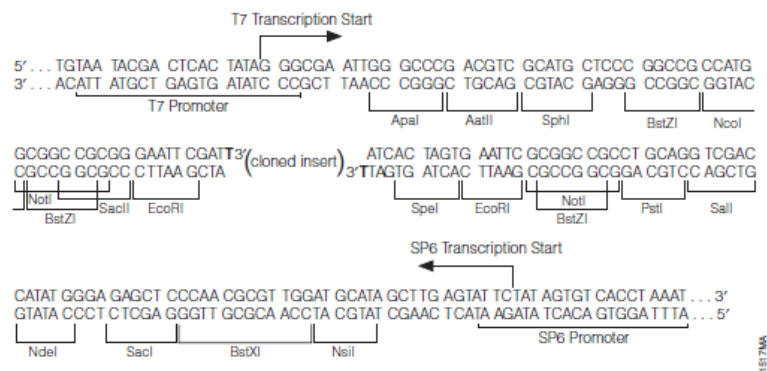
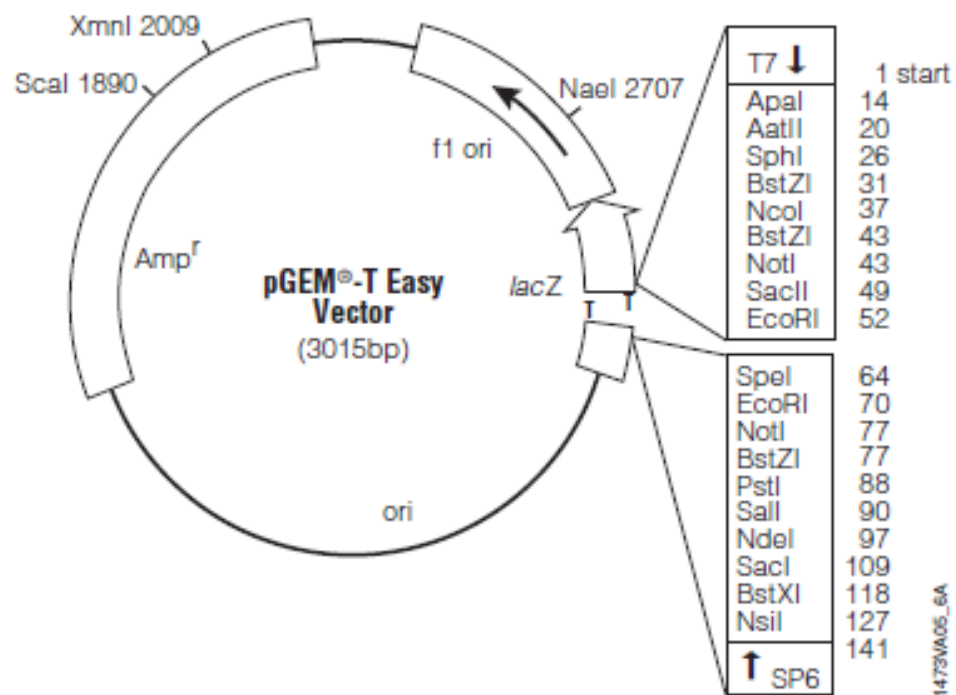
YONETANI, Y.; HOCHEGGER, H.; SONODA, E.; ET AL. Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 14, p. 4544-52. doi: 10.1093/nar/gki766, 2005.

YÁÑEZ, R. J.; PORTER, A. C. Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51. **Gene therapy**, v. 6, n. 7, p. 1282-90. doi: 10.1038/sj.gt.3300945, 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; ET AL. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>, 2009.

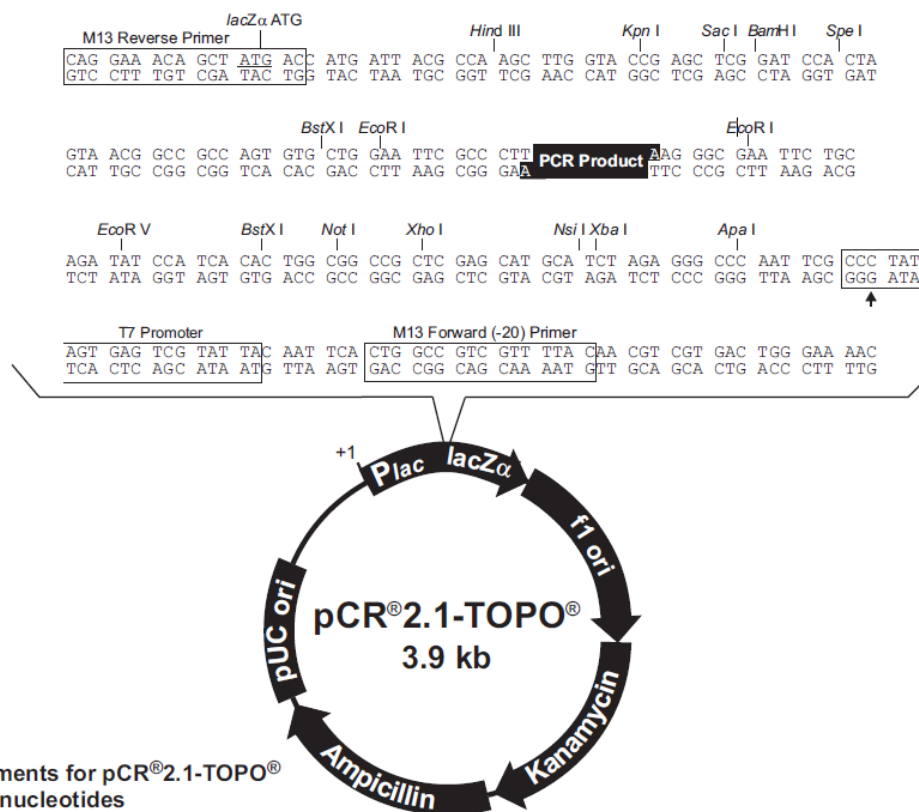
ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. Epidemiology, biochemistry and evolution of Trypanosoma cruzi lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 159-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677706>, 1999.

## **Anexo 1: Plasmídeos**

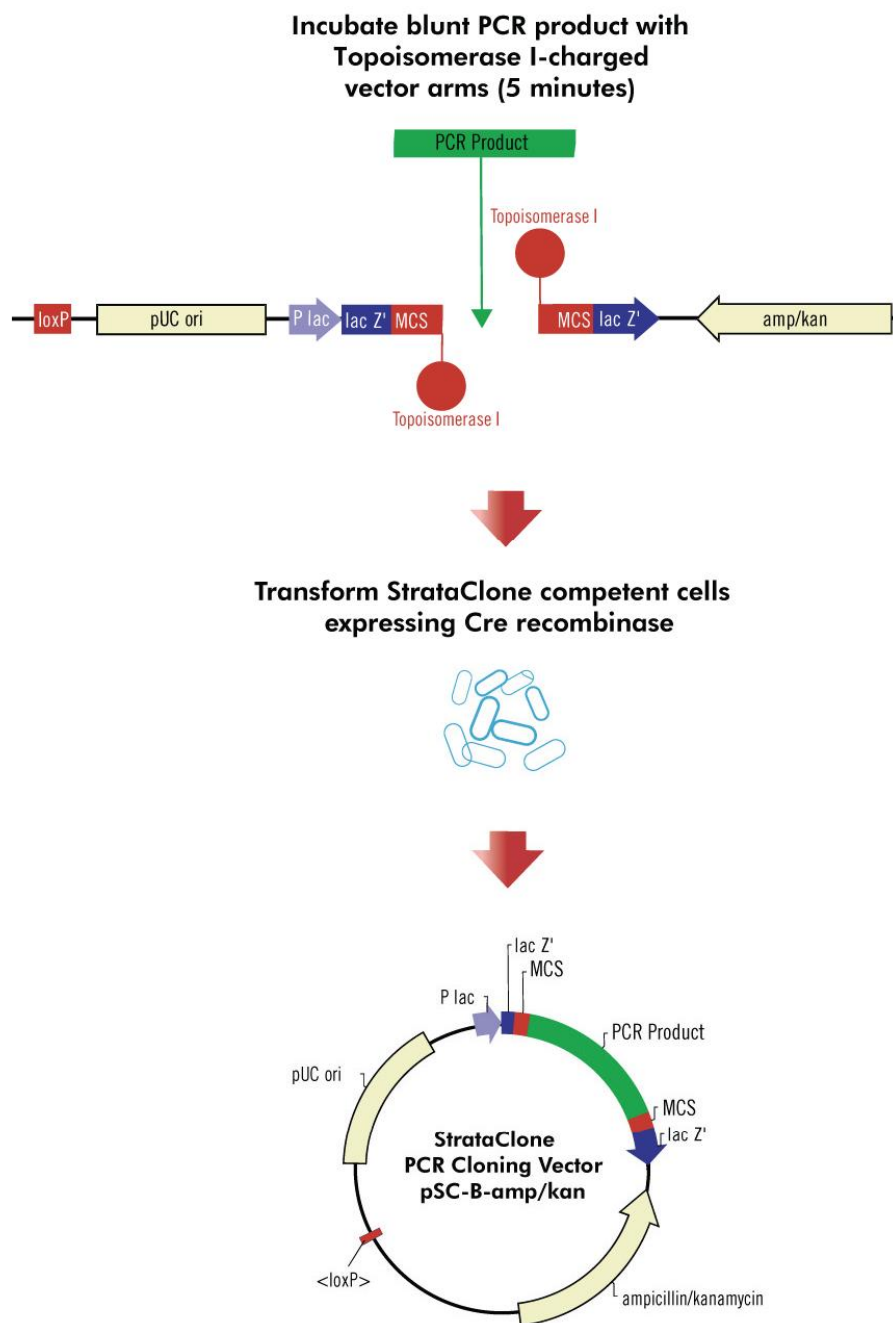


**ANEXO 1.1 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega).** Desenho esquemático do vetor pGEM-T Easy mostrando as características do vetor como a presença da origem de replicação (f1 ori), o gene de resistência a ampicilina (Amp<sup>r</sup>), os promotores T7 e SP6 e os sítios de restrição flanqueando o sítio múltiplo de clonagem que localiza-se na região codificadora da enzima galactosidase. O vetor pGEM-T Easy apresenta 3` T em ambas extremidades, aumentando a eficiência de ligação direta de produtos de PCR. (Em <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>).



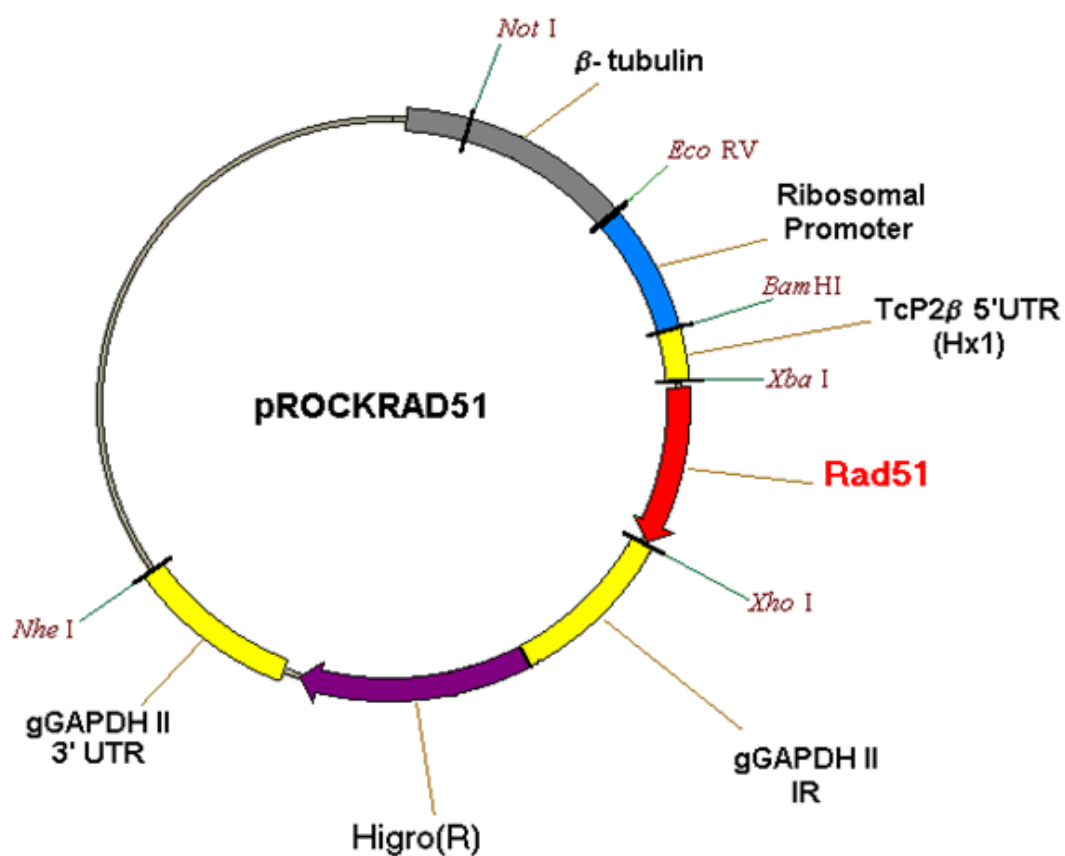


**Anexo 1.2 Mapa do vetor pCR®2.1-TOPO.** O mapa mostra as características do vetor como a presença da origem de replicação (f1 ori e PUC ori), dos genes de resistência a ampicilina e kanamicina, e em detalhe a sequência do sítio múltiplo de clonagem que localiza-se na região codificadora da galactosidase (*lacZ*). Os sítios de restrição são marcados para indicar o local correto da clivagem. A seta indica o início da transcrição pela polimerase T7 (Em [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)).

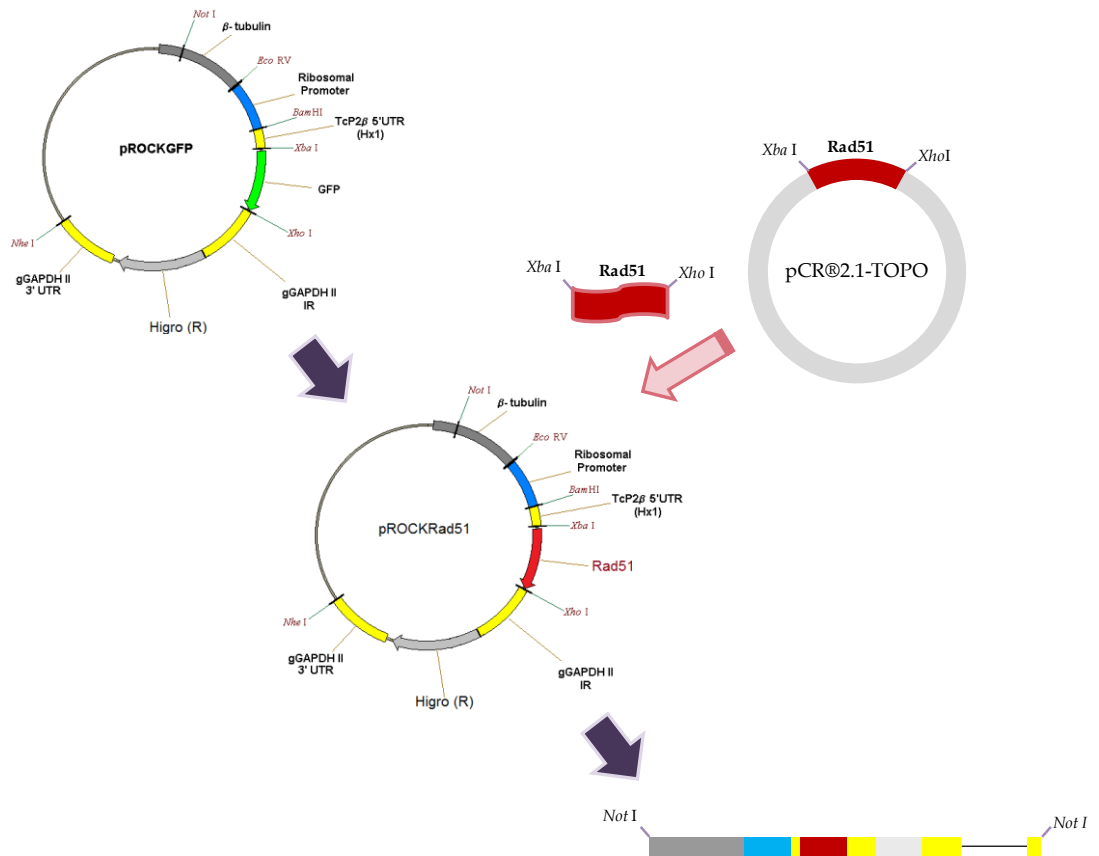


### **Anexo 1.3 Clonagem da *StrataClone blunt PCR* explora as atividades combinadas de topoisomerase I e Cre recombinase de bacteriófago P1.**

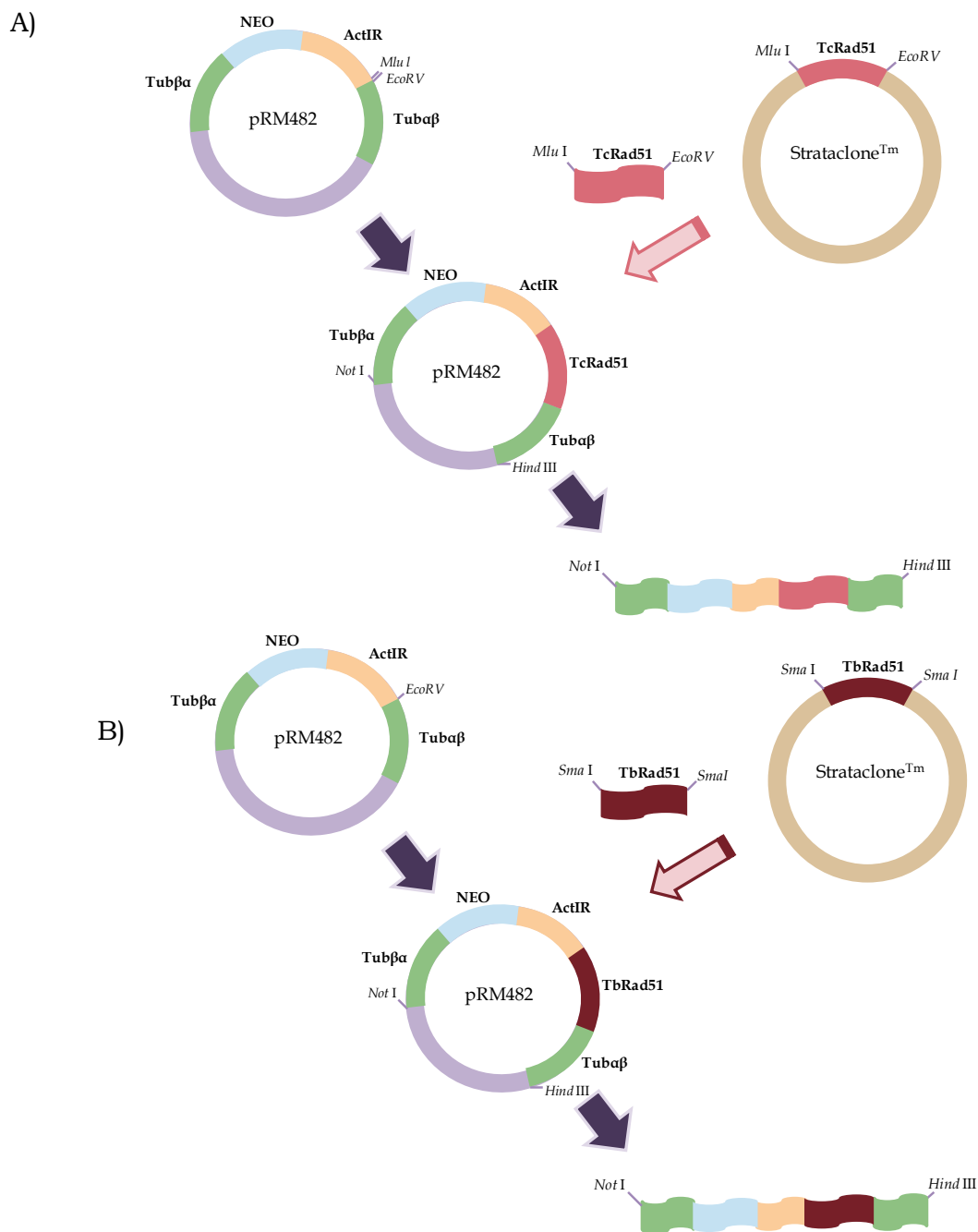
O vetor contém dois fragmentos de DNA com extremidades *blunt*, cada um contendo em uma extremidade a topoisomerase I e na outra uma sequência loxP. Produtos de PCR com extremidades *blunt* podem ser ligados através de ligação mediada pela topoisomerase I. A molécula linear resultante (vector armori-PCR product-vector armamp/kan) é então transformada em células competentes expressando transientemente a Cre recombinase. A recombinação mediada pela Cre entre os sítios loxP do vetor cria um DNA circular (pSC-B-amp/kan) que é proficiente para replicação em células crescendo em meio contendo ampicilina ou kanamicina. O produto do vetor resultante inclui um fragmento do gene da galactosidase (lac Z) que permite a triagem de colônias azuis e brancas.



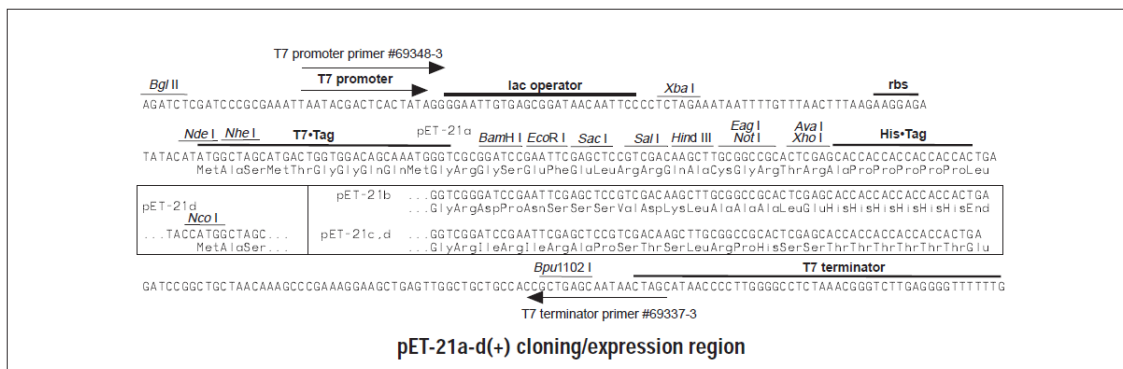
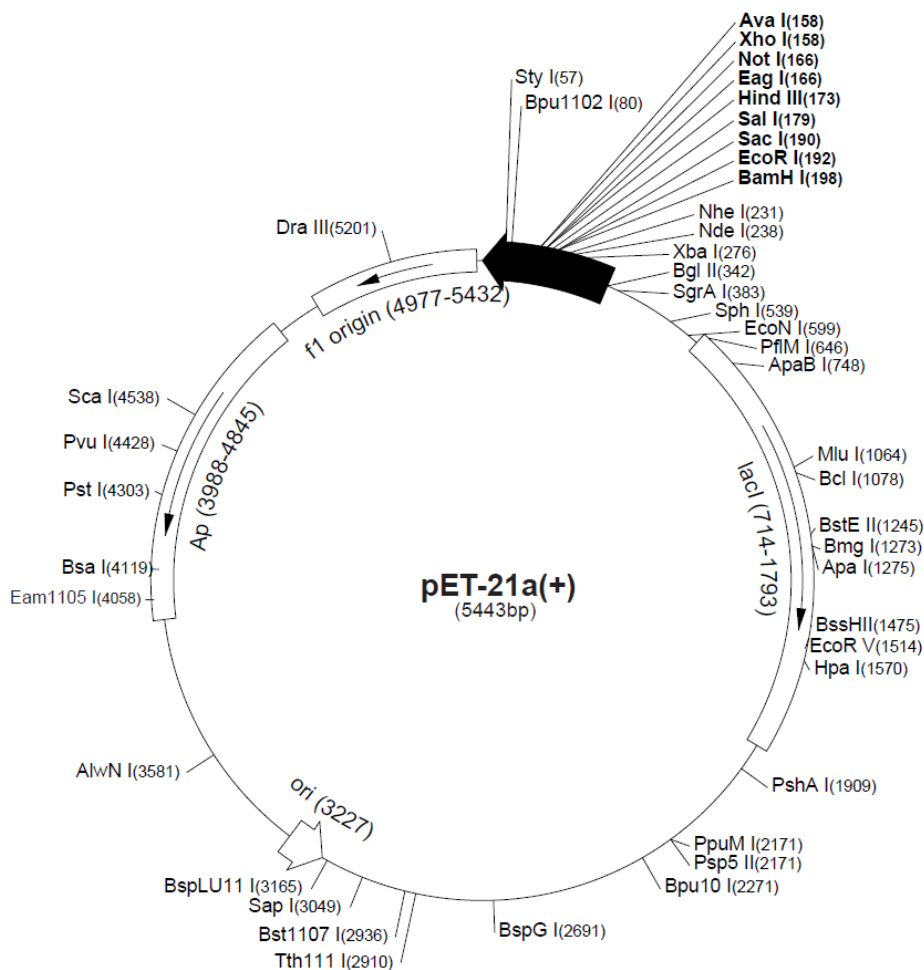
**Anexo 1.4 Representação do plasmídeo pROCK-Rad51.** Esse plasmídeo possui região com homologia ao gene da  $\beta$ -tubulina, além de um promotor ribossômico e regiões 5'UTR de TcP2 $\beta$ , 3'UTR e região intergênica de GAPDHII que auxiliam na expressão das proteínas de interesse, no caso, Rad51, e da resistência a higromicina (DaRocha *et al*, 2004).



**Anexo 1.5: Montagem do vetor para superexpressão de TcRad51.** Os vetores pROCKGFP e pCR2.1TOPO contendo TcRad51 foram digeridos com as enzimas *Xba* I e *Xho* I e posteriormente ligados formando o vetor pROCKRad51. Esse foi então digerido com a enzima *Not* I para transfecção em *T. cruzi*.



**Anexo 1.6: Montagem do vetor para complementação de TcRad51 ou TbRad51 em *T. brucei*.** A) Os vetores pRM482 e Strataclone<sup>™</sup> contendo TcRad51 foram digeridos com as enzimas *Mlu* I e *EcoRV* e posteriormente ligados. B) Para a complementação com TbRad51, o vetor pRM482 foi digerido com a enzima *EcoRV* e Strataclone<sup>™</sup> contendo TbRad51 foi digerido com a enzima *Sma* I e posteriormente ligados. Ambos foram então digeridos com as enzimas *Not* I e *Hind* III para transfecção em *T. brucei*.



**Anexo 1.7: Mapa do vetor pET 21A.** Esse vetor permite a expressão do gene de interesse em fusão com T7 N-terminal e uma sequência de histidinas na região C-terminal. Além disso, o vetor possui origem de replicação (f1 origin), o gene lacI (codifica para o repressor lac), promotor para T7 Rna polimerase, operador de lac, gene de resistência a ampicilina e sítio múltiplo de clonagem.

## **Anexo 2 - Artigos**

## Review Article

# Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*

**Danielle Gomes Passos-Silva, Matheus Andrade Rajão, Pedro Henrique Nascimento de Aguiar, João Pedro Vieira-da-Rocha, Carlos Renato Machado, and Carolina Furtado**

*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil*

Correspondence should be addressed to Carolina Furtado, carolfts@gmail.com

Received 17 June 2010; Revised 29 July 2010; Accepted 25 August 2010

Academic Editor: Ashis Basu

Copyright © 2010 Danielle Gomes Passos-Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A wide variety of DNA lesions arise due to environmental agents, normal cellular metabolism or intrinsic weaknesses in the chemical bonds of DNA. Diverse cellular mechanisms have evolved to maintain genome stability, including mechanisms to repair damaged DNA, to avoid the incorporation of modified nucleotides and to tolerate lesions (translesion synthesis). Studies of the mechanisms related to DNA metabolism in trypanosomatids have been very limited. Together with recent experimental studies, the genome sequencing of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*, three related pathogens with different life cycles and disease pathology, has revealed interesting features of the DNA repair mechanism in these protozoan parasites, which will be reviewed here.

## 1. Introduction

The trypanosomatids *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major* are the causative agents of Chagas disease, African sleeping sickness and leishmaniasis, respectively. These protozoan pathogens affect over 27 million people, primarily in developing countries within tropical and subtropical regions. There are no vaccines for these diseases and only a few drugs, which are largely ineffective due to toxicity and resistance [1].

These three pathogens (herein collectively referred to as Trityps) share many general characteristics, especially the presence of the unique mitochondrion, which contains a dense region named as kinetoplast. This mitochondrial region is composed by a network of several thousand minicircles and a few dozen maxicircles that form the kinetoplast DNA (kDNA) [2]. Minicircles encode guide RNAs that modify maxicircle transcripts by RNA editing while maxicircles are correspondent to the mitochondrial DNA in higher eukaryotes that encodes rRNAs and the subunits of respiratory complexes [2]. The mitochondrion replicates its DNA, maintains its structural integrity, and

undergoes division. Actually, kDNA replication always takes place earlier than mitosis, indicating that the kDNA may be needed for cell division, either by signaling a successful replication or by affecting the structure [3]. Furthermore, the trypanosome mitochondrion may hold vital metabolic pathways besides a possible role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, fatty acid metabolism, and apoptosis [3]. In fact, kDNA function and integrity may play a crucial role in the survival of some stages of Trityps lifecycles [3–5]. However, the kDNA is subjected to large amounts of endogenous oxidative damage generated by oxidative phosphorylation. Thus, an efficient kDNA maintenance mechanism is necessary to repair and avoid oxidative lesions in the mitochondrial DNA.

The draft genome sequences of the Trityps, released in 2005, have allowed a better understanding of the genetic and evolutionary characteristics of these parasites [6–9]. A comparison of gene content and genome architecture of *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* revealed large syntenic polycistronic gene clusters. In addition, many species-specific genes, such as large surface antigen families, occur at nonsyntenic chromosome-internal and subtelomeric regions. Syntenic discontinuities are associated with retroelements, structural



RNAs, and gene family expansion. Along with these factors, gene divergence, acquisition and loss, and rearrangement within the syntenic regions help to shape the genome of each parasite [8]. Expansion of gene families by tandem duplication is a potential mechanism by which parasites can increase expression levels to compensate for a general lack of transcriptional control due to polycistronic structure and the absence of general transcription factors [7].

Concerning the individual features of each parasite, which reflect differences in their lifecycles, *T. brucei* has large subtelomeric arrays that contain variant surface glycoprotein (VSG) genes used by the parasite to evade the mammalian immune system. Meanwhile, over 50% of the *T. cruzi* genome consists of repeated sequences, such as genes for large families of surface molecules, which might function in immune evasion and adaptation to an intracellular environment. *Leishmania* spp. has a simpler genome but also has the ability to amplify genomic regions. This genus contains genes for the synthesis of complex surface glycoconjugates that are likely to enhance survival in the macrophage phagolysosome [8].

Analyses of the Trityps genomes have identified differences in the DNA maintenance mechanisms (nuclear and mitochondrial) between Trityps and other eukaryotes. DNA repair systems are responsible for preserving the genome stability *via* correcting DNA lesions caused by damaging agents both from the environment and endogenous metabolic processes [10–14]. This system embraces several distinct pathways: (1) sanitization of the nucleotide pool, (2) direct reversal of the base modifications by demethylation processes, by the action of photolyases or dioxygenases, or (3) excision of (i) oxidized, methylated, or misincorporated bases by base excision repair (BER), (ii) bulky damage by nucleotide excision repair (NER), and (iii) misincorporated bases in the newly replicated DNA strand by mismatch repair (MMR). DNA is also susceptible to single-strand breaks (SSBs) and double-strand breaks (DSBs), which can be repaired by homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ). Even though these mechanisms repair the majority of DNA lesions, some of the damage remains, leading to mutations or block of the DNA replication. Alternative DNA polymerases can bypass these lesions in an error-free or error-prone fashion using a tolerance process known as translesion synthesis (TLS) [14]. Basic knowledge of DNA damage repair and tolerance processes is crucial to understanding how and why the genome is affected during the organism lifespan and how the cells will deal with it.

*T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* appear to be able to catalyze most of the DNA repair pathways [6–9]. Here, we briefly review the current information on DNA repair mechanisms in Trityps with an emphasis on experimentally characterized genes (Table 1). We highlight the main features of the major DNA repair pathways and report the presence or absence of key genes in Trityps. Most of the genes were previously identified by their genome projects [6–9, 15], and few of them were identified through similarity screening and domain analysis. The gene “absence” could truly represent a nonoccurrence of the gene (whose function

could be compensated or not by another gene), a large sequence divergence, or even an annotation error, which made the search for a homolog difficult.

## 2. Direct Repair

Two mechanisms of direct repair are present in Trityps: alkylation reversal and oxidative damage repair [6–9]. These pathways perform immediate chemical reversals of specific forms of DNA damage. Single homologs of O<sup>6</sup>-methylguanine alkyltransferase (MGMT) can be found in the three genomes. This enzyme catalyzes the repair of O<sup>6</sup>-meG, a critical mutagenic lesion that yields G:C to A:T transitions [41]. AlkB, an iron-dependent dioxygenase that reverses DNA lesions (1-meA and 3-meC) in single-strand DNA (ssDNA) or RNA [42], is also present in Trityps. The third mechanism of direct repair utilizes photolyases, which catalyze the splitting of pyrimidine dimers into the constituent monomers, a process called photoreactivation [43]. *T. cruzi* does not contain a clear photolyase homolog although *T. brucei* and *L. major* are thought to perform photoreactivation because they have a gene that contains an N-terminal photolyase domain [6–9]. The absence of photoreactivation as a repair mechanism for pyrimidine dimers in *T. cruzi* could be associated with the availability of transcription-coupled repair (TCR), which would efficiently deal with such lesions. This subject is discussed further in a later section.

## 3. Base Excision Repair

BER is the predominant pathway for dealing with a wide range of lesions that modify individual bases without large effects on the double helix structure. Such modifications on DNA bases can arise as a result of oxidation, alkylation, and/or deamination. The BER pathway consists of modified base recognition and removal by a DNA glycosylase, cleavage of the sugar-phosphate backbone, and excision of the abasic (apurinic-apyrimidinic, AP) site by a DNA AP endonuclease, followed by DNA synthesis and ligation steps [44].

The gapfilling and rejoining steps can occur by either of two subpathways: short-patch BER or long-patch BER. In the short-patch BER subpathway, only one nucleotide is replaced by DNA Pol $\beta$  and the nick is sealed by LIG3, all steps being coordinated by XRCC1 [45]. In long-patch BER, 2–13 nucleotides are replaced with the involvement of the replicative polymerases  $\delta$  (Pol $\delta$ ) or  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ) [46]. This polymerization gives rise to a “flap” structure that is removed by FEN1 through a single-stranded break for subsequent nick ligation by ligase 1 (LIG1) [47]. The long-patch mechanism also involves PCNA, which interacts and coordinates the enzymes involved, and poly ADP-ribose polymerase (PARP), that binds to DNA SSBs preventing DSBs and facilitates access for the long-patch machinery [48].

The primary components of the BER pathway have been identified in *T. cruzi*, *T. brucei* and *L. major* genomes [6–9] and are organized in the *TritypDB* database [15]. The Trityps possess the enzymes required to effectively

TABLE 1

Gene	Function	Organism (Gene ID)	Experimental data	Ref.
<i>BER Genes</i>				
Uracyl-DNA glycosylase (UNG)	Excision of uracil in DNA	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053511277.330)	(i) <i>In vitro</i> activity (enhanced by AP endonuclease) (ii) Heterologous complementation of <i>E. coli</i>	[16, 17]
AP endonuclease1	Cleavage of the phosphodiester bond at the 5' side of AP site	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053507083.30)	(i) Heterologous complementation of <i>E. coli</i>	[18]
		<i>L. major</i> (LmjF16.0680)	(i) Heterologous complementation of <i>E. coli</i> (ii) Increment of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and methotrexate resistance	[18–20]
POL $\beta$	Polymerization of DNA Strand displacement (long-patch) Cleavage of the 5' - dRP	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053503955.20)	(i) <i>In vitro</i> activity	[21]
		<i>T. brucei</i> (Tb927.5.2780)	(ii) Kinetoplast localization	[22]
PARP	Binding to ssDNA Stimulation of DNA synthesis and strand displacement	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053509721.60)	(i) <i>In vitro</i> activity (enhanced by SSB)	[23]
<i>NER Genes</i>				
TFIIH-TFB1	Component of TFIIH	<i>T. brucei</i> (Tb11.01.1200)	(i) Essential for initiating synthesis of spliced leader RNA	[24]
TFIIH-TFB2		<i>T. brucei</i> (Tb927.10.5210)		
TFIIH-TFB4		<i>T. brucei</i> (Tb11.01.7730)		
TFIIH-TFB5		<i>T. brucei</i> (Tb10.61.2600)		
TFIIH-XPB	Component of TFIIH (helicase)	<i>T. brucei</i> (Tb11.01.7950Tb927.3.5100)	(i) Interaction with TSP1 and TSP2	
TFIIH-XPB		<i>T. brucei</i> (Tb927.8.5980)	(i) Nuclear localization	
TFIIH-TSP1	Trypanosomatid-specific component of TFIIH	<i>T. brucei</i> (Tb927.1.1080)	(i) Essential for initiating synthesis of spliced leader RNA	[24]
TFIIH-TSP2		<i>T. brucei</i> (Tb11.01.5700)	(i) Nuclear localization (ii) Essential for initiating synthesis of spliced leader RNA	
XAB2*	May function as a scaffold for protein complex formation	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053509767.40)	(i) Putative	—
		<i>T. brucei</i> (Tb927.5.1340)	(i) Putative	—
		<i>L. major</i> (LmjF23.1550)	(i) Putative	—
<i>MMR Genes</i>				
MSH2	Repair of single base-base and IDL mismatches Heterodimers with MSH3 or MSH6	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053507711.320)	(i) Three isoforms with different efficiencies (ii) Involvement in oxidative stress response (independently from MLH1)	[25, 26]
		<i>T. brucei</i> (Tb927.10.11020)	(i) Involvement in oxidative stress response (independently from MLH1) (ii) Microsatellite instability and MNNG tolerance in <i>MSH2/MLH1</i> double mutants (iii) Regulatory role in HR	[26–28]
MLH1	Heterodimers with MutL homologs Matchmaker for coordinating events from mismatch binding to DNA synthesis	<i>T. brucei</i> (Tb927.8.6840)	(i) Microsatellite instability and MNNG tolerance in <i>MSH2/MLH1</i> double mutants (ii) Regulatory role in HR	[27, 28]

TABLE 1: Continued.

Gene	Function	Organism (Gene ID)	Experimental data	Ref.
<i>NHEJ Genes</i>				
Ku70	DSB recognition DSB bridging nucleolytic processing of the ends	<i>T. brucei</i> (Tb927.3.5030)	(i) Telomere maintenance	[29, 30]
Ku80	Telomere maintenance	<i>T. brucei</i> (Tb927.6.1760)		
<i>HR Genes</i>				
Mre11	DSB end resection Nuclease activities	<i>T. brucei</i> (Tb927.2.4390)	(i) Mre11 mutations cause impairment of HR and increased DNA damage sensitivity	[31, 32]
		<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053503801.30)	(i) Gene expression induced by DNA damaging agents (ii) Involved in DSBs and oxidative lesions repair	[33]
Rad51	Recombinases	<i>T. brucei</i> (Tb11.01.0360)	(i) Null mutants led to impairments in VSG switch and DNA transformation, besides a higher sensitivity to genotoxic agents	[34]
		<i>L. major</i> (LmjF28.0550)	(i) Gene expression induced by DNA-damaging agents	[35]
Dmc1	Recombinases	<i>T. brucei</i> (Tb09.211.1210)	(i) DMC1 mutation does not affect HR or VSG switching	[36]
BRCA2	ssDNA binding Recombination mediator	<i>T. brucei</i> (Tb927.1.640)	(i) Expansion in the number of BRC repeats (ii) BRCA2 mutants display antigenic variation impairment and genome instability	[37]
Rad51-3		<i>T. brucei</i> (Tb11.02.0150)	(i) Rad51-3 mutations resulted in reduced levels of VSG switching, altered RAD51 localization following DNA damage and DNA damage sensitized parasites	[38]
	ssDNA binding Recombination mediator activity			
Rad51-5		<i>T. brucei</i> (Tzb10.389.1770)	(i) Rad51-5 mutations caused altered RAD51 localization following DNA damage and DNA damage sensitized parasites	[38]
<i>TLS Genes</i>				
Pol $\eta$	Error-free bypass of cis-syn cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053511911.120)	(i) Heterologous complementation of <i>S. cerevisiae</i> (ii) <i>In vitro</i> bypass of 8-oxoG (iii) Overexpression increases H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> resistance	[39]
Pol $\kappa$	Bypass of N2-adducted dG lesions Extension of mismatched primer termini	<i>T. cruzi</i> (Tc00.1047053503755.30)	(i) Mitochondrial localization (ii) <i>In vitro</i> bypass of 8-oxoG (iii) DNA synthesis within recombination intermediates (iv) Overexpression increases zeocin, gamma radiation, and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> resistance	[40]

perform BER of different base lesions. However, it is not clear whether they can perform short-patch and long-patch BER since the homologs of LIG3 and XRCC1, which are supposedly essential for the short-patch mechanism [46, 49, 50], have not yet been identified in the three organisms.

However, these BER components are also absent in plants, and Córdoba-Cañero et al. [51] recently demonstrated that BER of uracil and abasic sites occurs in *Arabidopsis thaliana* whole-cell extracts by both single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. In contrast to the other Trityps,

the *L. major* genome allegedly does not encode for the PARP enzyme, which could play a role in the long-patch subpathway [7].

Different DNA glycosylases involved in the removal of modified bases from DNA have been characterized in Trityps. The Uracyl-DNA glycosylase from *T. cruzi* (TcUNG) was the first one to be characterized by Fárez-Vidal and coworkers [16]. They demonstrated that the enzyme activity was enhanced by the addition of an AP endonuclease from *L. major*, suggesting that there could be a functional interaction between the two enzymes [16]. Recently, Peña-Dias and colleagues [17] reported that TcUNG is able to complement *E. coli ung* mutants, and that the trypanosome enzyme has a catalytic activity similar to human UNG. Surprisingly, their results indicated that TcUNG is able to excise uracil in DNA *via* short-patch BER using a polymerase that follows a Pol $\beta$ -like pattern of inhibition. The characterization of the TcUNG protein sequence suggested that it has a probable PCNA-binding motif and could be directed either to the mitochondrion or nucleus [17].

Another glycosylase found in Trityps is 8-oxoG-DNA glycosylase (OGG1), an enzyme that removes the oxidative lesion 7,8-dihydro-8-oxoguanine (also known as 8-oxoguanine or 8-oxoG) when it is paired with cytosine. Among the DNA damage caused by reactive oxygen species (ROS), 8-oxoG is of outstanding interest because of its highly mutagenic potential and abundance [52]. This lesion has the ability to mimic thymine functionally, forming a stable 8-oxoG:A base pair. This conformation allows the replicative DNA polymerases to efficiently bypass 8-oxoG failing to detect this damaged DNA base [53]. A functional homolog of OGG1 in *T. cruzi* has been studied *in vivo* by Furtado and colleagues (unpublished data). This gene is able to complement yeast OGG1 mutants, reducing the mutation rate of these cells. The expression of OGG1-GFP fusion protein in *T. cruzi* revealed that the intracellular localization of OGG1 is both nuclear and mitochondrial. In fact, overexpression of the OGG1 in *T. cruzi* diminishes the levels of 8-oxoG within the nucleus and mitochondrion after hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) treatment. The unusual localization of OGG1 in the mitochondrion could indicate the importance of the maintenance of the kDNA integrity in this parasite.

In addition to OGG1 glycosylase, MutT and MutY also contribute to counteract the mutagenesis effects of 8-oxoG. These three enzymes constitute the so-called GO-system [54]. MutT degrades 8-oxo-dGTP from the nucleotide pool to 8-oxo-dGMP, preventing mutations that arise from the misincorporation of this oxidized form of dGTP. On the other hand, the DNA glycosylase MutY removes adenine from the 8oxoG:A pair [54]. When 8-oxo-dGTP is misincorporated opposite adenine in template DNA, MutY can fix an A:T to C:G mutation because it removes the correct adenine from the A:8oxoG pair. Therefore, when MutY is present, the action of MutT is crucial because oxidized nucleotides must be eliminated from the nucleotide pool [54]. At the time the genome sequence was released, homologs of 8-oxoguanine hydrolase MutT were not encountered in the Trityps genome [6–9]. A more

accurate search of the Trityps genomes revealed that MutT homologs are present in *T. brucei*, *L. major*, and possibly in *T. cruzi* [15]. This is not unexpected given that these parasites have putative MutY homologs [15]. Indeed, a *T. cruzi* MutY homolog has been characterized (Kunrath-Lima, unpublished data). This gene is able to complement MutY-deficient bacteria, diminishing its mutation rates. Moreover, the *T. cruzi* MutY recombinant protein removes the adenine paired with 8-oxoG *in vitro* from a 30 mer fluorescent substrate.

The AP endonucleases 1 from *T. cruzi* and *L. major* have also been characterized [18–20]. Both were able to efficiently complement AP endonuclease-deficient *E. coli*, conferring resistance to alkylating and oxidizing agents [18]. The *L. major* AP endonuclease was more extensively studied, and the purified protein exhibited endonuclease and high 3' phosphodiesterase activities on AP DNA *in vitro*. Moreover, *Leishmania* parasites overexpressing the AP endonuclease showed increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and methotrexate resistance as well as reduced DNA fragmentation [19]. The structural characteristics of the *L. major* enzyme exhibited similarities with previously characterized homologs [20].

Among the polymerases, Pol $\beta$  from *T. cruzi* and *T. brucei* have already been characterized [21, 22]. The TcPol $\beta$  localizes to the parasite kinetoplast and exhibits DNA polymerization and 5' dRP lyase activity [21]. Similarly, the TbPol $\beta$  characterization also showed that, in addition to a mitochondrial localization, it is active as a DNA polymerase and as a lyase [22]. The cellular localization of these polymerases highlights an important feature of the Trityps: the presence of kDNA. The kDNA structure is so complex that it requires an unusual replication mechanism, which differs from higher eukaryotes [55, 56]. This complexity is reflected in the DNA repair and replication machinery that can be localized to this organelle [7]. Pol $\beta$  is an example of a polymerase that shows a nuclear localization in higher eukaryotes [57] but is addressed to the kinetoplast in the Trityps [21, 22]. The *L. major* Pol $\beta$  has not yet been experimentally characterized; however, a Pol $\beta$  from *L. infantum* was shown to have a nuclear localization [58], which could indicate that the *L. major* polymerase is also nuclear, as their primary protein sequences showed 100% identity. The possibility that *L. major* possesses a nuclear Pol $\beta$ , combined with the fact that this parasite does not have the PARP enzyme [7, 15], suggests that short-patch BER could play an important role in nuclear DNA repair for this organism. As *Leishmania* proliferates inside macrophage phagolysosomes, a well-coordinated nuclear short-patch BER is essential to combat oxidative DNA damage during parasite nuclear DNA replication [58]. The Trityps genomes apparently do not encode for the other X-family polymerases, DNA polymerase lambda (Pol $\lambda$ ), and mu (Pol $\mu$ ) [7, 15]; thus, *L. major* may be the only Trityps parasite that has an X-family polymerase in the nucleus, reinforcing the importance of short-patch BER in this organelle.

PARP from *T. cruzi*, another enzyme that is involved in long-patch BER pathway, has also been characterized. The activity of this enzyme has been shown to be dependent on the presence of DNA and was enhanced by SSB in DNA



in a concentration-dependent manner. Moreover, it was demonstrated that DNA-damaging agents, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\beta$ -lapachone, induced PAR synthesis in the parasite nucleus, indicating that this enzyme could be involved in the signaling of this phenomenon [23].

#### 4. Nucleotide Excision Repair

Nucleotide excision repair is one of the most versatile DNA repair mechanisms, responsible for repairing lesions that alter the tridimensional DNA conformation, such as cisplatin adducts [59] and UV-induced lesions (pyrimidine dimers and pyrimidine photoproducts [60]). This mechanism can be divided into two major pathways: global genome repair (GGR), which operates in the noncoding parts of the genome and in the nontranscribed strand of active genes, and TCR, which is activated when a lesion appears in a gene that is being transcribed, ensuring that the transcribed strand of active genes has a higher priority for being repaired than the rest of the genome [61].

The GGR-NER mechanism comprises several steps: (i) distortion detection, performed by XPC and HR23B [62] or alternatively by the complex DDB1/XPE-DDB2 [63]; (ii) double-strand opening by the TFIIH complex *via* its XPB and XPD helicase subunits [64]; (iii) recruitment of XPA complexed with the three heterotrimeric replication protein A (RPA) subunits [65]; (iv) DNA incision by the XPG endonuclease (3' side of lesion [66]) and by the XPF-ERRC1 heterodimer (5' side of the lesion [67]); (v) gap filling by the replicative polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$  associated with PCNA [68, 69]; (vi) nick sealing by ligase III together with XRCC1 (in quiescent cells) or at a lower level by ligase I (in actively replicative cells) [70].

TCR-NER has a mechanism similar to GGR, but it differs in the initial steps because it lacks the XPC and DDB1 complexes. TCR-NER is triggered by the stalling of RNA polymerase II, which subsequently recruits CSA, CSB, and XAB2. The following steps are performed by the TFIIH complex as in GGR [71].

Although the entire NER mechanism is well conserved in nature, there is no sequence homology between the NER proteins from bacteria and eukaryotes. Despite the sequence conservation shared by the eukaryotic NER proteins, not all the genes that encode those proteins are found among distantly related phylogenetic groups. The most remarkable examples are the lack of XPA in *Arabidopsis thaliana* and the lack of XPA, XPC, and XPE in *Plasmodium falciparum* [72], which suggest that the NER mechanism can have slight variations between different taxa.

The Trityps genomes contain the majority of the NER components [7, 15], but the biochemical mechanisms of this pathway may present some minor differences from the higher eukaryotes. Some of the genes are duplicated. For example, Trityps have two copies of XPB and DDB1 appear duplicated in *T. cruzi*. However, others such as XPA could not be identified in Trityps. It is also possible that the Trityps ligation step is different from the ligation step from higher eukaryotes. The Trityps lack a recognizable

ligase III, which together with its partner XRCC1 plays a major role in this final step. However, because their genomes encode ligase I, it might be possible that the ligation step is performed exclusively by this protein in those parasites. DDB2, which interacts with DDB1 and recognizes UV-induced lesions, and RPA3, a component of the RPA heterotrimer, also could not be identified in the genomes of these trypanosomatids. The TFIIH complex shows some differences when compared to yeast and mammals because it does not contain the cyclin-activating kinase (CAK) sub-complexes. In addition to that, a recent study showed that *T. brucei* TFIIH contains two trypanosomatid-specific subunits of TFIIH (TSP1 and TSP2), which are indispensable for parasite viability and transcription of splice-leader gene [24]. These subunits are also present in the genomes of *T. cruzi* and *L. major*.

Protein-coding genes are constitutively transcribed in trypanosomatids [73]. This peculiarity implies that TCR could be one of the most crucial mechanisms involved in repairing DNA damage in those parasites. Surprisingly, the Trityps genomes apparently lack the gene that encodes CSA. Although the role of CSA in TCR is not clear, recent evidence indicates that CSA is involved in CSB ubiquitination and degradation following UV irradiation [74], which would restore transcription at a normal rate after the repair. The absence of an evident CSA in Trityps implies that the trypanosomatid TCR differs from the standard TCR mechanism, either by the lack or divergence of this component, or by the presence of an alternative protein to perform this step. This could be related to the peculiar constitutive transcription of Trityps. In fact, overexpression of *T. cruzi* DNA polymerase  $\eta$  (Pol $\eta$ ), involved in the translesion synthesis of pyrimidine dimers, and overexpression or haploinsufficiency of RAD51, a key protein in HR, do not confer any protection against UV irradiation, which could suggest that the UV-induced lesions are fully repaired before the cell enters the S-phase ([39], Passos-Silva et al., submitted). In addition, results obtained by our group show that *T. cruzi* repairs cisplatin-induced lesions at an extremely high rate, with total lesion removal in less than an hour (Rajão, unpublished data). Taken together, these results led us to hypothesize that, in *T. cruzi*, lesions that cause DNA distortions are readily detected and repaired by TCR because the great majority of the protein-coding genes are transcribed constitutively. Whether the CSA absence or the presence of an alternative CSA is an adaptation to this distinctive repair is a topic for future investigation. When compared to other taxa, GGR-NER in trypanosomatids seems to be similar to the GGR pathway encountered in plants, as both groups of organisms share peculiarities regarding the presence and absence of some NER genes. Although plants encode all the TFIIH subunits and CSA, the plant genome, like Trityps, does not possess an identifiable XPA, RPA3, or ligase 3. In addition, the plant genome also carries two copies of XPB [72]. Interestingly, these DNA repair similarities found in Trityps and plants can also be observed in the MMR pathway, which could suggest that both groups might share some commonalities in their DNA repair mechanisms.

## 5. Mismatch Repair

Postreplicative DNA mismatch repair promotes genetic stability by repairing DNA replication errors (single base-base mismatches and insertion or deletion loops, IDLs), inhibiting recombination between nonidentical DNA sequences and participating in responses to DNA damage induced by genotoxic agents, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cisplatin, and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) [75].

The fundamental aspects of the pathway have been highly conserved throughout evolution. In essence, postreplicative MMR operates through (i) DNA mismatch recognition by MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) or MutS $\beta$  (MSH2-MSH3), (ii) excision of the damaged DNA section mainly by ExoI, and (iii) DNA resynthesis by DNA Pol $\delta$  and ligation. Steps after DNA mismatch recognition are coordinated by MLH heterodimers that bind to MSH proteins and probably recruit and assemble downstream repair complexes. Strand discontinuities associated with DNA replication can serve as entry points for strand excision, conferring strand specificity to MMR [75].

Each trypanosomatid encodes a set of MMR proteins, which suggests they are fully competent for mismatch recognition and repair [7, 15]. Components of the MMR pathway are major players in processes known to generate genetic diversity, such as mutagenesis and DNA recombination. Evidences suggest that differences in MMR efficiency could be an important source of genetic diversity in organisms [76–79].

*T. cruzi* has a highly heterogeneous population, composed of a pool of strains with distinct characteristics such as morphology, growth rate, virulence, and sensitivity to drugs [80]. Despite its broad genetic diversity, three major lineages, named *T. cruzi* I, II and III, have been identified in the parasite population [81]. Studies with a number of molecular markers revealed that parasites belonging to the *T. cruzi* I lineage have lower genetic variability compared to *T. cruzi* II, and III [82–84]. The great genetic diversity observed in *T. cruzi* (and more precisely, in *T. cruzi* II strains) may play an important role in pathogenesis and survival of the parasite within its different hosts.

It is conceivable that components of DNA repair pathways participate in processes that resulted in increasing genetic variability within the parasite population [85]. MSH2, the core eukaryotic mismatch repair gene, has been characterized in *T. cruzi* [25, 26, 86]. Sequence analyses of TcMSH2 showed the existence of three distinct isoforms, named TcMSH2A, B, and C, encoded in the genome of *T. cruzi* I, III, and II strains, respectively [25]. It is possible that these isoforms have distinct protein activity, leading to variations in the efficiency of MMR. In fact, parasites that have TcMSH2A show increased sensitivity to cisplatin and MNNG, increased microsatellite instability, and greater resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when compared to parasites expressing TcMSH2B or TcMSH2C ([25], Campos et al., submitted). Further studies are needed to determine if these variations in MMR efficiency have a broader impact on genetic variation and behavior in *T. cruzi* strains. Attempts to generate TcMSH2-null mutants indicate that, in addition to its role

in MMR, TcMSH2 acts in the parasite response to oxidative DNA damage in an MMR independent manner [26].

In *T. brucei*, MSH2 has been studied along with MLH1 [27]. Mutations in both genes give rise to increased microsatellite instability and lead to increased tolerance to the alkylating agent MNNG [27]. Both phenotypes are consistent with an impairment of nuclear MMR activity [75]. These results indicate that MMR in trypanosomatids is active in repairing errors that arise during replication and in response to chemical damage.

MMR also plays a regulatory role in homologous recombination in *T. brucei* [28]. Double mutants of MSH2 and MLH1 show an increased frequency of homologous recombination, both between perfectly matched DNA molecules and between DNA molecules with divergent sequences. However, MMR has little influence on antigenic variation in this parasite [28]. This topic is discussed in detail in the “Double strand break section”.

*T. brucei* MSH2-null mutants are more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than wild-type cells [26]. Because MLH1-null mutants do not show this phenotype, TbMSH2 seems to have an additional role in dealing with oxidative damage, which may occur independently of MMR [26]. Interestingly, the heterologous expression of MSH2 from *T. cruzi* was able to counteract the increased sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the *T. brucei* MSH2-null mutant. However, it did not affect the classical MMR-deficient phenotypes, such as microsatellite instability and resistance to MNNG [26]. This differential activity of MSH2 has also been reported in colon adenocarcinoma cell lines where MSH2, but not MLH1, has been implicated in the repair of 8-oxoG [87]. In addition, *Helicobacter pylori*, which is suggested to be MMR-defective due to the lack of MutH and MutL homologs, presents a MutS homolog that is involved in repairing oxidative damage [88].

Four additional MSH-like genes can be found in the trypanosomatids: MSH3, MSH4, MSH5, and MSH6 [7, 15, 27]. The predicted MSH6 polypeptides in Trityps have N-terminal truncations relative to eukaryotic orthologues [27]. In comparison, MSH7, unique to plants, bears similar truncations in the N-terminus along with the conserved mismatch interaction residues indicative of the MSH6 subgrouping [89]. MSH4 and MSH5 predicted proteins that appear to lack an N-terminal mismatch interaction, indicating an absence of function in the mismatch repair and a possible role in meiotic recombination [27].

Concerning MutL-related genes, Trityps contain PMS1 and MLH1 [27]. Other MutL homologs, such as PMS2, MLH2, and MLH3, appear to be absent. Trypanosomatid MMR is therefore likely to involve only an MLH1-PMS1 heterodimer whereas the functions performed by the dimers formed between MLH1 and its three other binding partners in yeast are either absent or fulfilled by MLH1-PMS1.

## 6. Repair of Double-Strand Breaks

DNA DSBs are a particularly dangerous type of lesion. DSBs can arise when replication forks encounter blocking lesions, which leads to fork collapse, or can be induced by ionizing

radiation and radiomimetic chemicals. Failure to accurately repair such damage can result in cell death or large-scale chromosome changes, including deletions, translocations, and chromosome fusions that enhance genome instability. Two distinct and evolutionarily conserved pathways for DSB repair exist: homologous recombination and nonhomologous end joining [90].

**6.1. Nonhomologous End Joining.** NHEJ is frequently imprecise. The two ends of the DSB are held together and religated, often following the loss of some sequence by nucleolytic degradation or addition by polymerization [90].

Eukaryotic NHEJ is a multistep pathway beginning with limited end processing by the MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) complex and initial recognition of DSBs through end binding by Ku, a ring comprised of the Ku70, and Ku80 subunits. In higher eukaryotes, the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) is also recruited. In the final step, DNA ligase IV with its binding partners XRCC4 (Lif1 in yeast) and XLF (also called Cernunnos) seals the break [90].

NHEJ seems to be absent in trypanosomatids. With the exception of Mre11, Rad50, KU70 and KU80, no other factors implicated in NHEJ could be identified in these organisms. KU70 and KU80 have been identified in *T. brucei*, *T. cruzi*, and *L. major*. Studies in *T. brucei* have shown that these genes act in telomere maintenance [29, 30], a function they provide in addition to NHEJ [91]. However, the mutants of KU70 and KU80 did not display higher sensitivity to DNA-damaging agents, suggesting that they play, at most, a minor role in DSBs repair possibly due to the absence of NHEJ in this organism. The most striking absences are DNA ligase IV and XRCC4/Lif1 [92]. These absences in Trityps suggest one of two possibilities: either NHEJ is absent from these organisms or its catalytic components have been modified beyond recognition, perhaps using a distinct DNA ligase. These possibilities should be further investigated.

**6.2. Homologous Recombination.** HR is required for DNA DSBs repair and provides critical support for DNA replication in the recovery of stalled or broken replication forks. In addition, HR is involved in the repair of incomplete telomeres and in the correct segregation of homologous chromosomes during meiosis. The broad reaction scheme [93, 94] can be considered in three steps: initiation (or presynapsis) when the nucleolytic resection of DSBs occurs, generating single-stranded tails with 3'-OH ends; strand exchange (synapsis), when the end(s) of the DSB invades the intact DNA molecule *via* regions of sequence homology; resolution (postsynapsis), when strand exchange intermediates are separated and the DSB is repaired.

Homologous recombination is the major pathway of DSB repair in lower eukaryotes [95]. Essential components of this mechanism have been identified in the genome of *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major*. HR can contribute to different strategies evolved by trypanosomatids to create genetic variability that is needed for survival in their hosts. Antigenic variation is used by *T. brucei* to evade the host immune system through the switch of surface proteins (VSGs). This

mechanism is regulated by HR, allowing the switch of one VSG at time to the expression site [85]. Meanwhile, *T. cruzi* displays a wide range of surface molecules that are highly polymorphic and may represent a useful arsenal to evade immune systems [85]. Recent works have been suggesting that HR is responsible for creating mosaic genes of surface molecules through segmental gene conversion and for decreasing the divergence between duplicated regions such as surface multigenic families [83, 96]. In addition, experiments with genetic manipulation have shown that homologous recombination is the main mechanism for integration of transformed DNA in these organisms [97–100].

The complex of proteins involved in the presynapsis step of HR can be found in Trityps, such as MRE11, Rad50, NSB1, and RPA. However, only MRE11 from *T. brucei* has been fully characterized. Mutation of MRE11 causes impairment in *T. brucei* homologous recombination, increases DNA damage sensitivity, and leads to gross chromosomal rearrangements [31, 32]. MRE11 does not contribute to recombination during antigenic variation, an important mechanism used by *T. brucei* to escape host immune response as mentioned before [32].

The core step of HR is the search for homology, homologous DNA pairing, and strand exchange reaction that is mediated by recombinases, such as RAD51 and DMC1. Both enzymes are present in Trityps. DMC1, a putative meiosis-specific recombinase, has only been studied in *T. brucei*. The lack of DMC1 does not affect HR repair or VSG switching in this parasite [36]. The presence of genes involved in meiosis is an intriguing feature of Trityps because they reproduce primarily through clonal reproduction [101]. Even though the population structure of each parasite is largely clonal [101], evidence of genetic exchange in the wild-type populations of *T. brucei* [102], *T. cruzi* [103, 104], and *L. major* [105] has been presented. However, it is unclear whether or not the existence of meiotic recombination genes implies that the trypanosomatids use meiosis.

RAD51 has been characterized in the three trypanosomatids. The expression of RAD51 in *T. cruzi* and *L. major* is induced by DNA-damaging agents [33, 35]. Moreover, the overexpression of RAD51 in *T. cruzi* confers a faster recovery and a more efficient DNA repair of DSBs formed after genotoxic treatment [33]. In addition, *T. cruzi* RAD51 accumulates in the nucleus after exposure to gamma radiation (Passos-Silva et al., submitted). Besides, the levels of Rad51 in *T. cruzi* reflect its susceptibility to oxidative agents. The overexpression of TcRad51 confers a greater resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> whereas the deletion of one of the TcRad51 alleles increases the sensitivity when compared to wild-type parasites (Passos-Silva et al., submitted). Thus, Rad51 seems to be involved in a greater resistance to oxidative damage in *T. cruzi* DNA. An active response to oxidative stress is an important feature of *T. cruzi* and *L. major* because they have an intracellular stage in the host that is subjected to a rigorous oxidizing environment [106]. For *T. brucei*, RAD51, and consequently HR, is directly involved in antigenic variation. Null mutants of RAD51 led to impairments in VSG switch and DNA transformation and



a higher sensitivity to genotoxic agents [34]. However, an RAD51-independent recombination pathway is also present, as evidenced by two mechanisms detected in *T. brucei* RAD51 mutants: (i) antigenic variation by gene conversion [34] and (ii) integration of transformed DNA by homology-based recombination although the frequency of detection is low [29]. Interchromosomal HR is the major pathway used by *T. brucei* to repair DSBs, as demonstrated by Glover and colleagues [107]. After the generation of single DSB through SceI endonuclease, RAD51 accumulates into the foci and a G2M checkpoint is activated [107]. In addition, Tritryps show intriguing differences concerning gamma radiation treatment, which generates high levels of DSBs. *T. cruzi* and *L. major* are highly resistant to gamma radiation when compared to other eukaryotes [33, 108, 109]. However, this resistance is not seen in *T. brucei* (unpublished data). In fact, after gamma radiation treatment, the expression of RAD51 in *T. cruzi* and *L. major* are induced [33, 35] whereas the RAD51 levels in *T. brucei* do not increase [34]. As mentioned before, these intriguing differences concerning the efficiency of recombination in Tritryps could be due to the distinct mechanisms used by these organisms to create genetic variability and to evade the mammalian immune system.

The loading of recombinases in the ssDNA is a rate-limiting process that is enhanced by recombination mediators [93]. BRCA2, the RAD51 paralogs, and RAD54 are among the recombination mediators present in trypanosomatids. RAD52, however, seems to be absent in these organisms. Whether or not this has a significant impact on recombination is unclear. Unlike the yeast mutant, in which RAD52 is a key protein for HR, mouse RAD52 mutants display an exceedingly mild recombination defect and no ionizing radiation sensitivity [110]. It is unclear which proteins functionally replace the yeast RAD52 protein in mammalian cells or trypanosomatids. One candidate is BRCA2, which is not found in budding yeast. BRCA2 can interact with RAD51 through the BRC repeat motifs [111–113] and unrelated sequences. BRCA2 from *T. cruzi* and *Leishmania* have two nonidentical BRC repeats [37]. On the other hand, *T. brucei* BRCA2 has undergone an expansion in the number of BRC repeats (15 BRC repeats), and these elements are crucial for the efficiency of HR and RAD51 localization. In addition, *T. brucei* BRCA2 mutants display antigenic variation impairment and genome instability [37]. Four RAD51 paralogs appear to be encoded by *T. brucei* and *T. cruzi*, one of which appears to be missing in *L. major*. Two of the *T. brucei* RAD51-like proteins play a role in DNA repair and recombination [38].

Studies in *T. brucei* have been showing that HR in this organism is regulated by MMR through the rejection of HR between insufficiently homologous DNA sequences. This has been evidenced by experiments done with MSH2 mutants which are able to recombine mismatched substrates more efficiently than wild type cells. Around 100 bp of homology are required for an efficient Rad51-mediated recombination [28]. In contrast, the HR that occurs during VSG switching uses a short and divergent substrate such as the 70 bp repeats upstream of VSG genes. Thus, the VSG switching may

happen through a specific recombination pathway that is independent of MMR or the suppression of MMR would be necessary [100, 114].

## 7. Translesion Synthesis

Lesions in DNA can block replicative DNA polymerases (Pol $\delta$  and Pol $\epsilon$ ), causing the stall of the replication fork. This halt leads to PCNA monoubiquitination by Rad6/Rad18 complex, promoting the switch from replicative DNA polymerase to TLS DNA polymerase, which catalyses nucleotide insertion opposite the lesion. Then, nucleotide extension is performed mostly by DNA polymerase zeta (Pol $\zeta$ ). After the extension step, replicative DNA polymerases return to DNA synthesis [115]. TLS DNA polymerases contain a minimally stringent catalytic site, allowing for the accommodation of templates containing damaged bases. Moreover, this group of specialized DNA polymerases has lost 3'-5' proofreading activity, having a highly mutagenic character [116].

*T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* genomes encode for a wide variety of translesion synthesis proteins. Pol $\kappa$ , Pol $\eta$ , Rev1, and Pol $\zeta$  homologs are found in these species. PCNA and Rad6 homologs are also present. These parasites show an expansion of Pol $\kappa$  gene, present in two, ten, and three copies in *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* genomes, respectively [6–9]. The gene duplication/amplification displayed by Tritryps Pol $\kappa$  gene could result in an increment of Pol $\kappa$  gene expression level which would compensate the lack of pretranscriptional mechanisms in these organisms [9].

Pol $\eta$  from *T. cruzi* has been characterized *in vitro* and *in vivo* [39]. TcPol $\eta$  is able to complement yeast Rad30 mutant (Pol $\eta$ -null mutant), increasing yeast resistance to UV radiation, which indicates that Pol $\eta$  is able to bypass UV lesions. Parasites overexpressing TcPol $\eta$  show a higher resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. This resistance could be associated with the ability of TcPol $\eta$  to bypass 8-oxoG lesions *in vitro*, suggesting that this enzyme is able to incorporate nucleotides opposite oxidative lesions as well. In contrast to the result seen in yeast, parasites overexpressing this nuclear polymerase do not show a higher resistance to UV radiation. The lack of conferred resistance might be related to the number of lesions remaining during S phase because it is possible that the majority of UV lesions would be repaired by TCR-NER prior to DNA replication, as the majority of the protein-coding genes are constitutively transcribed in this organism [39].

*T. cruzi* DNA polymerase kappa has been studied by our group. One copy of TcPol $\kappa$  localizes in the *T. cruzi* mitochondrion [40]. This result indicates that *T. cruzi* is the first organism described in the literature to contain one exclusively mitochondrial Pol $\kappa$ . Mitochondrial TcPol $\kappa$  bypasses 8-oxoG *in vitro*, which correlates with the increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance observed in parasites overexpressing this protein. This DNA polymerase could also participate in the homologous recombination pathway in *T. cruzi* because it synthesizes DNA within recombination intermediates. Reinforcing this hypothesis, TcPol $\kappa$  overexpression confers higher resistance to gamma radiation and zeocin, which are



agents known to cause DSBs [40]. Recent results have shown that the other copy of TcPolk has nuclear localization (Rajão, unpublished results).

TLS deals with DNA damage that blocks the replication fork, thus rescuing the cell from death. This accounts for the survival increase displayed by TcPolk-overexpressing parasites when treated with agents that cause DSBs. In addition, TcPolk- and TcPol $\eta$ -overexpressing cells also presented increased resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment [39, 40]. The presence of TLS DNA polymerases that efficiently bypass oxidative lesions might be important during *T. cruzi* lifecycle, especially in the intracellular amastigote phase, when this organism deals with ROS generated by the infected host cell [117]. Moreover, because TLS can operate in an error-prone fashion, TLS can generate DNA punctual mutations in the parasite genome [116]. This can be correlated with the generation of genetic variability in Trityps, notably in surface molecules. In fact, mutation is considered one of the main driving forces that increase the divergence between genes from multigenic families in *T. cruzi*, in contrast to the genetic conversion, another main driving force that decreases this divergence [83, 96]. A variable repertoire of surface molecules is a key strategy for *T. cruzi* to achieve a successful rate of infection. These proteins interact with different molecules on the host cell membranes and the extracellular matrix, increasing its chance to adapt to distinct cell types and hosts [83, 96]. Besides, the polymorphism of *T. cruzi* surface proteins contributes to evade cellular immune response of the mammalian host through the presentation of a broad range of possible target epitopes to CD8+T cells. This can result in an inefficient activation of naïve CD8+T cells, leading to a delayed protective immune response [118]. Thus, TLS can affect the general diversity in the organism, which is important for acquiring evolutionary novelty and for adaptation to the parasitic lifestyle.

## 8. Conclusion

The genome sequencing of *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* has provided insight into the DNA maintenance mechanisms in these pathological protozoa [6–9]. Experimental data have revealed additional particular features of these systems in the Trityps, which presumably reflect the distinct aspects of the infectious cycle that shape the survival strategies of each protozoa pathogen. Among these particularities, the unexpected mitochondrial localization of some typically nuclear proteins (Furtado, unpublished data) [21, 22, 40] and the additional roles of a few proteins in response to oxidative treatment were highlighted in this paper (Passos-Silva, submitted) [26, 39, 40]. The former is important during the replicative stages of the parasites when the metabolic activity is higher and the unique mitochondrion is then exposed to higher amounts of ROS generated by oxidative phosphorylation [3–5]. The later feature is particularly critical during the intracellular stage of the parasites *L. major* and *T. cruzi* when they are subjected to the immune response of mammalian host cells through oxidative stress [106, 119].

The DNA damage repair and tolerance mechanisms of Trityps are also involved in the generation of genetic variability which raises the successful rate of infection through the increasing of surface molecules diversity in *T. cruzi* and the expanding of the repertoire of VSGs in *T. brucei* [85]. Indeed, strains of *T. cruzi* that have a higher genetic variability (possibly a reflection of a less efficient MMR—Campos et al., unpublished data) are frequently associated with human infection [120, 121]. On the other hand, HR regulates antigenic variation in *T. brucei*, the strategy used by this parasite to evade mammalian immune system [106]. A clear association between DNA repair in *L. major* and evasion of the mammalian immunological response has not been established yet possibly due to a relatively narrow range of studies that investigate DNA repair in this organism.

Essentially, with the exception of NHEJ, the major DNA repair pathways appear to be present in Trityps [7]. Further studies are necessary to clarify the information about DNA repair pathways in Trityps, specifically the differences in Trityps machinery from the typical eukaryotic machinery for DNA repair, which could provide potential points of attack against the parasites.

## Acknowledgments

This work is supported by funds from CNPq, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais—FAPEMIG (Brazil), and the Howard Hughes Medical Institute.

## References

- [1] K. Nussbaum, J. Honek, C. M. Cadmus, and T. Efferth, “Trypanosomatid parasites causing neglected diseases,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 15, pp. 1594–1617, 2010.
- [2] W. de Souza, “Structural organization of *Trypanosoma cruzi*,” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 1, pp. 89–100, 2009.
- [3] A. Schnauffer, G. J. Domingo, and K. Stuart, “Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA,” *International Journal for Parasitology*, vol. 32, no. 9, pp. 1071–1084, 2002.
- [4] A. O. M. Stoppani, R. Docampo, J. F. de Boiso, and A. C. C. Frasc, “Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 2, no. 1, pp. 3–21, 1980.
- [5] R. Dey, C. Meneses, P. Salotra, S. Kamhawi, H. L. Nakhasi, and R. Duncan, “Characterization of a Leishmania stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence,” *Molecular Microbiology*, vol. 77, no. 2, pp. 399–414, 2010.
- [6] M. Berriman, E. Ghedin, C. Hertz-Fowler et al., “The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*,” *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 416–422, 2005.
- [7] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu et al., “The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease,” *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 409–415, 2005.
- [8] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, G. Blandin et al., “Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa,” *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 404–409, 2005.

- [9] A. C. Ivens, C. S. Peacock, E. A. Wortley et al., "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 436–442, 2005.
- [10] J. H. J. Hoeijmakers, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 366–374, 2001.
- [11] D. Branzei and M. Foiani, "Maintaining genome stability at the replication fork," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 11, no. 3, pp. 208–219, 2010.
- [12] P. Huertas, "DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 17, no. 1, pp. 11–16, 2010.
- [13] K. D. Arczewska and J. T. Kuśmierk, "Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 2. Role of bacterial mutator gene homologues in human disease. Overview of nucleotide pool sanitization and mismatch repair systems," *Acta Biochimica Polonica*, vol. 54, no. 3, pp. 435–457, 2007.
- [14] L. S. Waters, B. K. Minesinger, M. E. Wiltrout, S. D'Souza, R. V. Woodruff, and G. C. Walker, "Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 73, no. 1, pp. 134–154, 2009.
- [15] M. Aslett, C. Aurrecochea, M. Berriman et al., "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae," *Nucleic Acids Research*, vol. 38, supplement 1, pp. D457–D462, 2009.
- [16] M. E. Fárez-Vidal, C. Gallego, L. M. Ruiz-Pérez, and D. González-Pacanowska, "Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease," *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 7, pp. 1549–1555, 2001.
- [17] J. Peña-Díaz, M. Akbari, O. Sundheim et al., "*Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair," *Journal of Molecular Biology*, vol. 342, no. 3, pp. 787–799, 2004.
- [18] J. Pérez, C. Gallego, V. Bernier-Villamor, A. Camacho, D. González-Pacanowska, and L. M. Ruiz-Pérez, "Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*," *Nucleic Acids Research*, vol. 27, no. 3, pp. 771–777, 1999.
- [19] C. Gallego, A. M. Estévez, E. Fárez, L. M. Ruiz-Pérez, and D. González-Pacanowska, "Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 141, no. 2, pp. 191–197, 2005.
- [20] A. E. Vidal, M. Harkiolaki, C. Gallego et al., "Crystal Structure and DNA Repair Activities of the AP Endonuclease from *Leishmania major*," *Journal of Molecular Biology*, vol. 373, no. 4, pp. 827–838, 2007.
- [21] D. d. O. Lopes, B. L. F. Schamber-Reis, C. G. Regis-da-Silva et al., "Biochemical studies with DNA polymerase  $\beta$  and DNA polymerase  $\beta$ -PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance," *DNA Repair*, vol. 7, no. 11, pp. 1882–1892, 2008.
- [22] T. T. Saxowsky, G. Choudhary, M. M. Klingbeil, and P. T. Englund, "*Trypanosoma brucei* has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 49, pp. 49095–49101, 2003.
- [23] S. H. Fernández Villamil, R. Baltanás, G. D. Alonso, S. C. Vilchez Larrea, H. N. Torres, and M. M. Flawiá, "TcPARP: a DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*," *International Journal for Parasitology*, vol. 38, no. 3–4, pp. 277–287, 2008.
- [24] J. H. Lee, H. S. Jung, and A. Günzl, "Transcriptionally active TFIIH of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 11, pp. 3811–3820, 2009.
- [25] L. Augusto-Pinto, S. M. R. Teixeira, S. D. J. Pena, and C. R. Machado, "Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency," *Genetics*, vol. 164, no. 1, pp. 117–126, 2003.
- [26] A. Machado-Silva, S. M. R. Teixeira, G. R. Franco et al., "Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage," *Gene*, vol. 411, no. 1–2, pp. 19–26, 2008.
- [27] J. S. Bell, T. I. Harvey, A.-M. Sims, and R. McCulloch, "Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*," *Molecular Microbiology*, vol. 51, no. 1, pp. 159–173, 2004.
- [28] J. S. Bell and R. McCulloch, "Mismatch repair regulates homologous recombination, but has little influence on antigenic variation, in *Trypanosoma brucei*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 46, pp. 45182–45188, 2003.
- [29] C. Conway, C. Proudfoot, P. Burton, J. D. Barry, and R. McCulloch, "Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*," *Molecular Microbiology*, vol. 45, no. 6, pp. 1687–1700, 2002.
- [30] C. J. Janzen, F. Lander, O. Dreesen, and G. A. M. Cross, "Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 22, pp. 6575–6584, 2004.
- [31] K. S. W. Tan, S. T. G. Leal, and G. A. M. Cross, "*Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 125, no. 1–2, pp. 11–21, 2002.
- [32] N. P. Robinson, R. McCulloch, C. Conway, A. Browitt, and J. D. Barry, "Inactivation of Mre11 does not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 29, pp. 26185–26193, 2002.
- [33] C. G. Regis-da-Silva, J. M. Freitas, D. G. Passos-Silva et al., "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 149, no. 2, pp. 191–200, 2006.
- [34] R. McCulloch and J. D. Barry, "A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation," *Genes and Development*, vol. 13, no. 21, pp. 2875–2888, 1999.
- [35] P. G. McKean, J. K. Keen, D. F. Smith, and F. E. Benson, "Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 115, no. 2, pp. 209–216, 2001.
- [36] C. Proudfoot and R. McCulloch, "*Trypanosoma brucei* DMC1 does not act in DNA recombination, repair or antigenic variation in bloodstream stage cells," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 145, no. 2, pp. 245–253, 2006.

- [37] C. L. Hartley and R. McCulloch, "Trypanosoma brucei BRCA2 acts in antigenic variation and has undergone a recent expansion in BRC repeat number that is important during homologous recombination," *Molecular Microbiology*, vol. 68, no. 5, pp. 1237–1251, 2008.
- [38] C. Proudfoot and R. McCulloch, "Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 21, pp. 6906–6919, 2005.
- [39] M. B. De Moura, B. L. F. Schamber-Reis, D. G. P. Silva et al., "Cloning and characterization of DNA polymerase  $\eta$  from *Trypanosoma cruzi*: roles for translesion bypass of oxidative damage," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 50, no. 5, pp. 375–386, 2009.
- [40] M. A. Rajão, D. G. Passos-Silva, W. D. DaRocha et al., "DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate," *Molecular Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 185–197, 2009.
- [41] A. E. Pegg, "Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases," *Mutation Research*, vol. 462, no. 2-3, pp. 83–100, 2000.
- [42] L. Aravind and E. V. Koonin, "The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases," *Genome Biology*, vol. 2, no. 3, p. RESEARCH0007, 2001.
- [43] A. Sancar, "Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 47, pp. 32153–32157, 2008.
- [44] A. B. Robertson, A. Klungland, T. Rognes, and I. Leiros, "Base excision repair: the long and short of it," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 6, pp. 981–993, 2009.
- [45] Y. Kubota, R. A. Nash, A. Klungland, P. Schär, D. E. Barnes, and T. Lindahl, "Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase  $\beta$  and the XRCC1 protein," *EMBO Journal*, vol. 15, no. 23, pp. 6662–6670, 1996.
- [46] G. Frosina, P. Fortini, O. Rossi et al., "Two pathways for base excision repair in mammalian cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 16, pp. 9573–9578, 1996.
- [47] K. Kim, S. Biade, and Y. Matsumoto, "Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 15, pp. 8842–8848, 1998.
- [48] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, and G. G. Poirier, "Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions," *Biochemical Journal*, vol. 342, no. 2, pp. 249–268, 1999.
- [49] I. I. Dianova, K. M. Sleeth, S. L. Allinson et al., "XRCC1-DNA polymerase  $\beta$  interaction is required for efficient base excision repair," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 8, pp. 2550–2555, 2004.
- [50] Y. Uchiyama, R. Takeuchi, H. Kodera, and K. Sakaguchi, "Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes," *Biochimie*, vol. 91, no. 2, pp. 165–170, 2009.
- [51] D. Córdoba-Cañero, T. Morales-Ruiz, T. Roldán-Arjona, and R. R. Ariza, "Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants," *Plant Journal*, vol. 60, no. 4, pp. 716–728, 2009.
- [52] S. Boiteux and J. P. Radicella, "The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 377, no. 1, pp. 1–8, 2000.
- [53] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, and L. S. Beese, "Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase," *Nature*, vol. 431, no. 7005, pp. 217–221, 2004.
- [54] T. Tsuzuki, Y. Nakatsu, and Y. Nakabeppu, "Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis," *Cancer Science*, vol. 98, no. 4, pp. 465–470, 2007.
- [55] R. Woodward and K. Gull, "Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*," *Journal of Cell Science*, vol. 95, no. 1, pp. 49–57, 1990.
- [56] M. M. Klingbeil, S. A. Motyka, and P. T. Englund, "Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*," *Molecular Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 175–186, 2002.
- [57] D. N. Foster and T. Gurney Jr., "Nuclear location of mammalian DNA polymerase activities," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 251, no. 24, pp. 7893–7898, 1976.
- [58] S. Taladriz, T. Hanke, M. J. Ramiro et al., "Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation," *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 18, pp. 3822–3834, 2001.
- [59] E. E. Trimmer and J. M. Essigmann, "Cisplatin," *Essays in Biochemistry*, vol. 34, pp. 191–211, 1999.
- [60] M. Tijsterman, R. De Pril, J. G. Tasseront-De Jong, and J. Brouwer, "RNA polymerase II transcription suppresses nucleosomal modulation of UV- induced (6-4) photoproduct and cyclobutane pyrimidine dimer repair in yeast," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 1, pp. 934–940, 1999.
- [61] T. Nospikel, "Nucleotide excision repair: variations on versatility," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 6, pp. 994–1009, 2009.
- [62] M. Araki, C. Masutani, M. Takemura et al., "Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 22, pp. 18665–18672, 2001.
- [63] J. Tang and G. Chu, "Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein," *DNA Repair*, vol. 1, no. 8, pp. 601–616, 2002.
- [64] F. Coin, V. Oksenyh, and J.-M. Egly, "Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair," *Molecular Cell*, vol. 26, no. 2, pp. 245–256, 2007.
- [65] K. Sugawara, J. M. Y. Ng, C. Masutani et al., "Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair," *Molecular Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 223–232, 1998.
- [66] A. O'Donovan, A. A. Davies, J. G. Moggs, S. C. West, and R. D. Wood, "XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair," *Nature*, vol. 371, no. 6496, pp. 432–435, 1994.
- [67] D. Mu, D. S. Hsu, and A. Sancar, "Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 14, pp. 8285–8294, 1996.
- [68] O. Popanda and H. W. Thielmann, "The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1129, no. 2, pp. 155–160, 1992.
- [69] M. K. K. Shivji, M. K. Kenny, and R. D. Wood, "Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair," *Cell*, vol. 69, no. 2, pp. 367–374, 1992.



- [70] J. Moser, H. Kool, I. Giakzidis, K. Caldecott, L. H. F. Mullenders, and M. I. Foustier, "Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III $\alpha$  in a cell-cycle-specific manner," *Molecular Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 311–323, 2007.
- [71] S. Tornaletti, "DNA repair in mammalian cells: transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 6, pp. 1010–1020, 2009.
- [72] R. M. A. Costa, V. Chiganças, R. D. S. Galhardo, H. Carvalho, and C. F. M. Menck, "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway," *Biochimie*, vol. 85, no. 11, pp. 1083–1099, 2003.
- [73] S. Martínez-Calvillo, J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martínez, R. G. Manning-Cela, and E. E. Figueroa-Angulo, "Gene expression in trypanosomatid parasites," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 525241, 15 pages, 2010.
- [74] R. Groisman, I. Kuraoka, O. Chevallier et al., "CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome," *Genes and Development*, vol. 20, no. 11, pp. 1429–1434, 2006.
- [75] M. J. Schofield and P. Hsieh, "Dna mismatch repair: molecular mechanisms and biological function," *Annual Review of Microbiology*, vol. 57, pp. 579–608, 2003.
- [76] K. Drotschmann, P. V. Shcherbakova, and T. A. Kunkel, "Mutator phenotype due to loss of heterozygosity in diploid yeast strains with mutations in MSH2 and MLH1," *Toxicology Letters*, vol. 112–113, pp. 239–244, 2000.
- [77] J. E. LeClerc, B. Li, W. L. Payne, and T. A. Cebula, "High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens," *Science*, vol. 274, no. 5290, pp. 1208–1211, 1996.
- [78] O. Tenaillon, F. Taddei, M. Radman, and I. Matic, "Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation," *Research in Microbiology*, vol. 152, no. 1, pp. 11–16, 2001.
- [79] O. Tenaillon, B. Toupance, H. L. Nagard, F. Taddei, and B. Godelle, "Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria," *Genetics*, vol. 152, no. 2, pp. 485–493, 1999.
- [80] A. M. Macedo, C. R. Machado, R. P. Oliveira, and S. D. J. Pena, "*Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 1, pp. 1–12, 2004.
- [81] J. M. de Freitas, L. Augusto-Pinto, J. R. Pimenta et al., "Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*," *PLoS Pathogens*, vol. 2, no. 3, p. e24, 2006.
- [82] C. A. Buscaglia and J. M. Di Noia, "*Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease," *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 5, pp. 419–427, 2003.
- [83] G. C. Cerqueira, D. C. Bartholomeu, W. D. DaRocha et al., "Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 157, no. 1, pp. 65–72, 2008.
- [84] F. Mathieu-Daudé, M.-F. Bosseno, E. Garzon et al., "Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains," *Parasitology Research*, vol. 101, no. 5, pp. 1355–1363, 2007.
- [85] C. R. Machado, L. Augusto-Pinto, R. McCulloch, and S. M. R. Teixeira, "DNA metabolism and genetic diversity in *Trypanosomes*," *Mutation Research*, vol. 612, no. 1, pp. 40–57, 2006.
- [86] L. Augusto-Pinto, D. C. Bartholomeu, S. M. R. Teixeira, S. D. J. Pena, and C. R. Machado, "Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*," *Gene*, vol. 272, no. 1–2, pp. 323–333, 2001.
- [87] P. Pitsikas, D. Lee, and A. J. Rainbow, "Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2," *Mutagenesis*, vol. 22, no. 3, pp. 235–243, 2007.
- [88] G. Wang, P. Alamuri, M. Z. Humayun, D. E. Taylor, and R. J. Maier, "The *Helicobacter pylori* MutS protein confers protection from oxidative DNA damage," *Molecular Microbiology*, vol. 58, no. 1, pp. 166–176, 2005.
- [89] K. M. Culligan and J. B. Hays, "*Arabidopsis* MutS homologs - AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a novel AtMSH7—form three distinct protein heterodimers with different specificities for mismatched DNA," *Plant Cell*, vol. 12, no. 6, pp. 991–1002, 2000.
- [90] M. Shrivastav, L. P. De Haro, and J. A. Nickoloff, "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice," *Cell Research*, vol. 18, no. 1, pp. 134–147, 2008.
- [91] B. Williams and A. J. Lustig, "The paradoxical relationship between NHEJ and telomeric fusion," *Molecular Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 1125–1126, 2003.
- [92] P. Burton, D. J. McBride, J. M. Wilkes, J. D. Barry, and R. McCulloch, "Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology," *Eukaryotic Cell*, vol. 6, no. 10, pp. 1773–1781, 2007.
- [93] C. Wyman, D. Ristic, and R. Kanaar, "Homologous recombination-mediated double-strand break repair," *DNA Repair*, vol. 3, no. 8–9, pp. 827–833, 2004.
- [94] B. O. Krogh and L. S. Symington, "Recombination proteins in yeast," *Annual Review of Genetics*, vol. 38, pp. 233–271, 2004.
- [95] M. K. Bhattacharyya, D. E. Norris, and N. Kumar, "Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 4, no. 2, pp. 91–98, 2004.
- [96] D. C. Bartholomeu, G. C. Cerqueira, A. C. A. Leão et al., "Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 10, pp. 3407–3417, 2009.
- [97] C. E. Clayton, "Genetic manipulation of kinetoplastida," *Parasitology Today*, vol. 15, no. 9, pp. 372–378, 1999.
- [98] S. M. Beverley, "Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age," *Nature Reviews Genetics*, vol. 4, no. 1, pp. 11–19, 2003.
- [99] R. McCulloch, E. Vassella, P. Burton, M. Boshart, and J. D. Barry, "Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*," *Methods in Molecular Biology*, vol. 262, pp. 53–86, 2004.
- [100] R. L. Barnes and R. McCulloch, "*Trypanosoma brucei* homologous recombination is dependent on substrate length and homology, though displays a differential dependence on mismatch repair as substrate length decreases," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 10, pp. 3478–3493, 2007.

- [101] M. Tibayrenc and F. J. Ayala, "The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on," *Trends in Parasitology*, vol. 18, no. 9, pp. 405–410, 2002.
- [102] A. Tait, "Evidence for diploidy and mating in trypanosomes," *Nature*, vol. 287, no. 5782, pp. 536–538, 1980.
- [103] A. R. Bogliolo, L. Lauria-Pires, and W. C. Gibson, "Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination," *Acta Tropica*, vol. 61, no. 1, pp. 31–40, 1996.
- [104] H. J. Carrasco, I. A. Frame, S. A. Valente, and M. A. Miles, "Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 54, no. 4, pp. 418–424, 1996.
- [105] J. M. Kelly, J. M. Law, C. J. Chapman, G. J. J. M. Van Eys, and D. A. Evans, "Evidence of genetic recombination in *Leishmania*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 46, no. 2, pp. 253–264, 1991.
- [106] C. Bogdan and M. Rölinghoff, "How do protozoan parasites survive inside macrophages?" *Parasitology Today*, vol. 15, no. 1, pp. 22–28, 1999.
- [107] L. Glover, R. McCulloch, and D. Horn, "Sequence homology and microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, no. 8, pp. 2608–2618, 2008.
- [108] G. K. Takeda, R. Campos, J. Kieffer et al., "Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 28, no. 1, pp. 15–18, 1986.
- [109] M. Seo, D. K. Chun, S. T. Hong, and S. H. Lee, "Influence of heat shock, drugs, and radiation on karyotype of *Leishmania major*," *Korean Journal of Parasitology*, vol. 31, no. 3, pp. 277–283, 1993.
- [110] T. Rijkers, J. Van Den Ouweland, B. Morolli et al., "Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18, no. 11, pp. 6423–6429, 1998.
- [111] A. K. C. Wong, R. Pero, P. A. Ormonde, S. V. Tavtigian, and P. L. Bartel, "RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 51, pp. 31941–31944, 1997.
- [112] P.-L. Chen, C.-F. Chen, Y. Chen, J. Xiao, Z. D. Sharp, and W.-H. Lee, "The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 9, pp. 5287–5292, 1998.
- [113] L. Y. Marmorstein, T. Ouchi, and S. A. Aaronson, "The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 23, pp. 13869–13874, 1998.
- [114] P. A. Blundell, G. Rudenko, and P. Borst, "Targeting of exogenous DNA into *Trypanosoma brucei* requires a high degree of homology between donor and target DNA," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 76, no. 1-2, pp. 215–229, 1996.
- [115] A. R. Lehmann, A. Niimi, T. Ogi et al., "Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch," *DNA Repair*, vol. 6, no. 7, pp. 891–899, 2007.
- [116] S. Prakash, R. E. Johnson, and L. Prakash, "Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 74, pp. 317–353, 2005.
- [117] S. Gupta, V. Bhatia, J.-J. Wen, Y. Wu, M.-H. Huang, and N. J. Garg, "*Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 10, pp. 1414–1421, 2009.
- [118] R. L. Tarleton, "Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*," *Current Opinion in Immunology*, vol. 19, no. 4, pp. 430–434, 2007.
- [119] S. Gupta, J. J. Wen, and N. J. Garg, "Oxidative Stress in Chagas Disease," *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2009, Article ID 190354, 8 pages, 2009.
- [120] J. M. Freitas, E. Lages-Silva, E. Crema, S. D. J. Pena, and A. M. Macedo, "Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 4, pp. 411–417, 2005.
- [121] O. Fernandes, R. H. Mangia, C. V. Lisboa et al., "The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene," *Parasitology*, vol. 118, no. 2, pp. 161–166, 1999.

1 The Role of Rad51 in the Repair of DNA Double-Strand Breaks and Oxidative Lesions in  
2 *Trypanosoma cruzi*

3 Passos-Silva, D. G.1, Nardelli, S.C.2, Franco, G. R.1, Macedo, A. M.1, Pena, S.D.J.1, Schenkman,  
4 S. 2, McCulloch R. 3, Teixeira, S.M.1, Machado, C.R1.

5 1. Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av.  
6 Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil

7 2. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São  
8 Paulo, Rua Botucatu 862 8A, São Paulo, São Paulo, 04023-062, Brazil.

9 3. Wellcome Centre for Molecular Parasitology, Glasgow Biomedical Research Centre, University  
10 of Glasgow, 120 University Place, Glasgow, Scotland, UK.

11

12 Corresponding author.

13 Carlos Renato Machado

14 [crmachad@icb.ufmg.br](mailto:crmachad@icb.ufmg.br)

15 Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av.  
16 Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 486, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil

17 Tel.: +55 31 34992628; fax: +55 31 34992984

18

19

20 **Abstract**

21 Rad51 is the central enzyme of homologous recombination. In this report, we describe the role of  
22 Rad51 in DNA repair in the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas  
23 disease. Besides, this parasite can resist high doses of gamma radiation, a DNA double-strand  
24 break–inducing agent. We found that TcRad51 protein levels increase in epimastigote forms of this  
25 parasite after gamma radiation and this increase does not occur when one of the *TcRad51* alleles  
26 is deleted. Immunolocalisation experiments demonstrated that immediately after gamma radiation  
27 treatment, TcRad51 forms foci in the nucleus of epimastigote cells, with the highest intensity 24  
28 hours after treatment. This phenotype is altered in the single allele knockout cells, which showed a  
29 delay in the formation of TcRad51 foci that were less intense. In contrast, *T. cruzi* cells  
30 overexpressing TcRad51 demonstrated intense foci prior to gamma radiation. The partial knockout  
31 of *TcRad51* causes a delay in growth recovery following irradiation. However, when the TcRad51  
32 haploinsufficient parasites and the cells overexpressing TcRad51 were exposed to UV light and  
33 cisplatin, two DNA cross-link-inducing agents, no difference in growth recovery was observed.  
34 Similarly, bloodstream forms of TbRad51 knockouts in flagellated protozoan *T. brucei*, the  
35 causative agent of sleeping sickness in Africa, also showed no greater sensitivity to cisplatin as  
36 wild type cells. In contrast, the overexpression of TcRad51 in *T. cruzi* conferred resistance to  
37 hydrogen peroxide, an oxidative inducing agent, whereas the disruption of one allele of *TcRad51*  
38 increased the sensitivity of the cells to hydrogen peroxide. Similarly, *T. brucei* Rad51 deficiency  
39 also showed increased sensitivity to hydrogen peroxide. We conclude that Rad51 plays at most a  
40 minor role in DNA cross-link repair in *T. brucei* and *T. cruzi*. However, Rad51 is a critical protein in  
41 double-strand break repair and in the repair of oxidative lesions in trypanosomatids.

42

43

44 **Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Homologous recombination, Rad51, oxidative lesions, DNA repair.

45

46

## 47 **1. Introduction**

48 Homologous recombination (HR) is a universally conserved mechanism responsible for  
49 maintaining genome integrity [1]. HR plays an essential role in the repair of DNA double-strand  
50 breaks (DSBs) generated as a result of replication fork collapse, from processing of spontaneous  
51 damage or from exposure to DNA-damaging agents such as gamma radiation [1].

52 The Rad51 protein is a key component of the homologous recombination machinery. This protein  
53 catalyses the invasion of exposed 3' single strand DNA ends at a DSB into an intact DNA duplex,  
54 generating homologous pairing and promoting recombination [2]. Studies in yeast, mammalian  
55 cells and other organisms have demonstrated a role for Rad51 in DSB repair following ionising  
56 radiation and other genotoxic agents [3-6]. The Rad51 protein can be re-localised in response to  
57 DNA damage to form foci (punctuate staining) in the nucleus of cells from different organisms [7,  
58 8]. *T. brucei*, a kinetoplastid parasite found in Africa, also demonstrated these foci when treated  
59 with phleomycin and after induction of DSBs by *I-SceI* cleavage [9, 10]. Therefore, the generation  
60 of Rad51 foci after DNA damage seems to be a conserved response, as it also has been seen in  
61 *Escherichia coli* RecA, a Rad51 homolog [11]. Genetic analysis of these foci suggests that they  
62 may represent sites of ongoing recombination [12].

63 The process of homologous recombination has also been described in trypanosomatids, a group of  
64 protozoa that cause several human and animal diseases. African trypanosomes use DNA  
65 recombination to evade the mammalian immune system through antigenic variation. The mutation  
66 of Rad51 in *T. brucei* impairs HR, thereby reducing the frequency of antigenic variation and  
67 increasing sensitivity of the organism to DSB-inducing agents [5]. Moreover, *T. brucei* mutants  
68 deficient in additional HR factors, including Mre11, Brca2 and two paralogs of Rad51, also  
69 demonstrate greater sensitivity to methyl methanesulfonate and, in some cases, reduced antigenic  
70 variation [9,13,14]. The sequencing of the *T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania major* genomes  
71 revealed that trypanosomatids appear to lack some of the core proteins involved in non-  
72 homologous end joining (NHEJ) [15]. In accordance to that, further experiments in *T. brucei*  
73 revealed only end-joining mechanism that was mediated by sequence microhomology, suggesting



74 that HR plays a central role in the repair of DSBs [16, 17]. Reinforcing this idea, Glover and  
75 colleagues (2008) [10] demonstrated that a single DSB in *T. brucei* chromosomes is preferentially  
76 repaired by HR and is associated with Rad51 foci formation and cell cycle arrest. Rad51 from  
77 *Leishmania major* is also involved in DSB repair because treatment with phleomycin resulted in  
78 increased mRNA expression of this gene [18].

79 In spite of these advances, little work has been done to study homologous recombination in  
80 *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* is the causative agent of Chagas disease, a debilitating illness that  
81 affects 9 million people in Latin America [19]. It is normally transmitted by reduviid insects *via* the  
82 faeces of the vector. The insect takes up bloodstream trypomastigotes in a blood meal from an  
83 infected mammal. The parasite replicates as an epimastigote in the midgut of the insect and  
84 transforms into an infective metacyclic trypomastigote in the hindgut. After contamination with bug  
85 excreta, the trypomastigotes invade nucleated mammalian cells and develop into amastigotes that  
86 are the proliferative form in the vertebrate host. At a high density, amastigotes give rise to  
87 bloodstream trypomastigotes that escape from inside the cell to invade new cells [20]. The  
88 published data support predominant long-term clonal evolution in *T. cruzi*, with only occasional  
89 genetic recombination by nuclear hybridisation. However, *T. cruzi* contains a highly homozygous  
90 genome in the majority of strains [21, 22], which is not expected for organisms that predominantly  
91 reproduce asexually. It has been suggested that highly active gene conversion and mitotic  
92 recombination may be responsible for the genome homogenisation in this organism [21-23]. The  
93 presence of repetitive sequences, such as large gene families of surface proteins, representing  
94 50% of the *T. cruzi* genome, also indicates the presence of active homologous recombination  
95 pathways in this organism [15]. Indeed, gene conversion can be considered the main driving force  
96 in the expansion of these families and in the homogenisation of family members arranged in  
97 tandem, as described by Cerqueira and colleagues (2008) [24].

98 The first step in understanding the molecular mechanisms of homologous recombination in *T. cruzi*  
99 is the characterisation of TcRad51. TcRad51 mRNA is expressed during all three stages of the *T.*  
100 *cruzi* life cycle; however, the expression level is two times higher in amastigotes when compared to  
101 other forms [6]. Remarkably, *T. cruzi* is resistant to high levels of gamma radiation (1–5 kGy) [25],

102 and the parasites repair the shattered chromosomes in less than 48 hours after treatment,  
103 overcoming the DNA damage–induced growth arrest a few days later. A direct role for TcRad51 in  
104 DSB repair was observed following the treatment of epimastigotes with ionising radiation, which  
105 induced *TcRad51* gene expression. Indeed, the overexpression of TcRad51 in *T. cruzi* results in  
106 faster chromosome repair, with intact chromosomes visible within 24 hours. This is reflected in  
107 faster growth recovery [6] when compared with wild type cells. Cells overexpressing TcRad51 also  
108 present greater resistance to zeocin, another double-strand break–inducing agent. To further  
109 understand the role of Rad51 in DSB repair in *T. cruzi*, we generated single *TcRad51* allele  
110 knockout cells (*TcRad51* -/+) through the targeted gene deletion of *TcRad51*. We then compared  
111 *TcRad51* -/+ knockout cells to TcRad51-overexpressing cells [6] and wild type cells after exposure  
112 to different genotoxic agents (gamma radiation, UV light, cisplatin and hydrogen peroxide). These  
113 agents cause distinct lesions, allowing us to evaluate the role of TcRad51 in the repair of DSBs,  
114 cross-links or oxidative damage. Our findings demonstrate that the level of TcRad51 dictates the  
115 sensitivity of the parasites to DSBs and to oxidative agents, but not to cross-linking agents. We  
116 also present data demonstrating that changes in the level of TcRad51 alter the kinetics of TcRad51  
117 localisation following gamma radiation. Additionally, we show that knockout of Rad51 in *T. brucei*  
118 also resulted in greater sensitivity to oxidative damage but not to cross-linking agents, such as  
119 cisplatin, reinforcing the role of Rad51 in the repair of oxidative (but not cross-linked) lesions in  
120 trypanosomatids.

121

## 122 **2. Materials and methods**

### 123 *Parasite growth*

124 Epimastigote forms of the CL Brener strain of *T. cruzi* were grown at 28°C in liver infusion tryptose  
125 medium (pH 7.3) (LIT) [26] supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), streptomycin  
126 sulphate (0.2 g L<sup>-1</sup>) and penicillin (200,000 units L<sup>-1</sup>). Both wild type cells and TcRad51-  
127 overexpressing cells, generated by Regis-da-Silva *et al.* (2006) [6], were used.

128 The bloodstream forms of the Lister 427 strain of *T. brucei* [27] were grown at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in  
129 HMI-9 medium [28] supplemented with 10% of FBS, streptomycin sulphate (0.2 g L<sup>-1</sup>) and penicillin  
130 (200,000 units L<sup>-1</sup>). Both wild type cells and TbRad51-knockout cells, generated by McCulloch and  
131 Barry [5], were used.

#### 132 *Plasmid construction and transfection*

133 The vectors used to delete *TcRad51* were generated as follows. Primers were designed to amplify  
134 roughly 500 bp fragments from the 5' and 3' regions of the gene, respectively. These were cloned  
135 immediately upstream and downstream, respectively, of the hygromycin phosphotransferase gene  
136 (Hygro). The constructs were linearised using *Apa I* and *Sac I* and electroporated into *T. cruzi*  
137 epimastigotes.

138 Parasite transfection was performed as previously described [29]. The transfected parasites were  
139 selected after 4 weeks of culturing in the presence of hygromycin (200 µg ml<sup>-1</sup>). Hygromycin-  
140 resistant clones were isolated as previously described [30].

#### 141 *Anti-TcRad51 antiserum and western blot*

142 Recombinant TcRad51, purified as a C-terminal his-tagged variant in *E. coli*, was used to  
143 immunise mice in order to obtain an anti-TcRad51 antiserum. C57Bl/6 mice were immunised with  
144 30 µg of TcRad51-his protein by intramuscular injection. Three subsequent boosts (15, 30 and 45  
145 days after the first immunisation) were performed. Mouse serum was collected 15 days after the  
146 fourth immunisation, and non-immune serum was obtained from a non-immunised mouse of the  
147 same lineage. All research protocols involving mice used in the course of this study were reviewed  
148 and approved by the local Ethics Committee Research at Universidade Federal de São Paulo  
149 (CEP – N° 1560/07).

150 For western blot assays, *T. cruzi* epimastigotes in the exponential phase of growth were used to  
151 prepare protein extracts. The cells were washed and resuspended in SDS gel-loading buffer (100  
152 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4 % SDS, 0.2 % bromophenol blue, 20 % glycerol) to a  
153 final concentration of 2×10<sup>5</sup> cells and boiled for 10 min, generating the whole cell extract. Proteins  
154 were separated on a 10% SDS polyacrylamide gel and blotted (2 h, 20 mA) onto nitrocellulose

155 membranes. The blots were then incubated with the primary antibody (anti-TcRad51: 1:2000 or  
156 anti-alpha tubulin monoclonal, Abcam: 1:12,000) and peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (GE):  
157 1:10,000 or 1:12,000). Antibody binding was visualised using the ECL-Plus Western Blot Detection  
158 System (Amersham Biosciences), and the image was taken using a STORM phosphoimager  
159 (Amersham Bioscience).

#### 160 *TcRad51 immunolocalisation*

161 TcRad51 immunolocalisation experiments were performed by allowing  $2 \times 10^5$  cells prewashed with  
162 PBS to adhere to glass slides, and the cells were then fixed with 4% *p*-formaldehyde in PBS for 20  
163 min. The slides were then washed three times with PBS, treated with 0.1% Triton X-100 in PBS for  
164 5 min and incubated for 30 min with 1% bovine serum albumin diluted in PBS. The slides were  
165 then incubated overnight with the polyclonal anti-TcRad51 antiserum diluted in PBS containing 1%  
166 bovine serum albumin. The slides were washed three times, and staining was detected with an  
167 Alexa Fluor 555–conjugated anti-mouse antiserum (Invitrogen) in the presence of 0.01 mM 4',6-  
168 diamidino-2-phenylindole (DAPI). Vectashield (Vector Laboratories) was used for mounting, and  
169 the slides were visualised with a 100× oil immersion objective (1.3 numerical aperture) on a Nikon  
170 E600 microscope coupled to a Nikon DXM1200F camera. Images were processed for colour using  
171 Adobe Photoshop.

172 Fluorescence quantification was done using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For each  
173 time point after gamma radiation, roughly thirty parasites were analysed. Nuclei were individually  
174 examined, and the mean labelling intensity under sub-saturating conditions was determined. A  
175 Student's *t*-test and a one-way analysis of variance with a Bonferoni post-test were performed  
176 using GraphPad Prism (version 3.0) software.

#### 177 *Genotoxic treatment*

178 Wild type CL Brener epimastigotes were compared with TcRad51-overexpressing and *TcRad51* -  
179 /+ knockout parasites after plating cells at a density of  $1 \times 10^7$  cells per ml in the presence or  
180 absence of genotoxic agents in LIT medium. The cultures were treated with 0, 150, 200 or 250  $\mu\text{M}$   
181  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0, 5,000, 10,000 or 15,000  $\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$  UVC irradiation (254 nm) using a germicidal lamp, or 0, 25,  
182 50 or 75  $\mu\text{M}$  cisplatin. Following these treatments, the number of surviving cells was counted after

183 2 days of treatment without changing the medium. For gamma irradiation, the cell cultures were  
184 exposed to a cobalt ( $^{60}\text{Co}$ ) irradiator (Gamma Radiation Laboratory – CDTN) with a dose of 1,578  
185  $\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  for 20 min. The cell count was determined over a period of 16 days. In all four experiments,  
186 the cell number was determined in a cytometry chamber using erythrosine vital stain to differentiate  
187 live and dead cells. All experiments were performed in triplicate, and each figure is representative  
188 of at least two experiments.

189 Lister 427 wild type bloodstream cells [27] were compared with TbRad51-knockout cells by plating  
190 at a density of  $5\times 10^4$  cells per ml in the presence or absence of genotoxic agents. The parasite  
191 cultures were treated with 0, 50, 100 or 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  or 0, 1.7, 3.3 or 6.6  $\mu\text{M}$  cisplatin. Following  
192 these treatments, the number of surviving cells was counted after 2 days of treatment. The cell  
193 number was determined in a cytometry chamber, and the experiments were performed in triplicate.

194

### 195 **3. Results**

#### 196 *1. Generation of TcRad51 single knockout cells*

197 To evaluate the role of TcRad51 in *Trypanosoma cruzi*, we tried to generate null mutants of  
198 TcRad51. DNA fragments corresponding to the 5' and 3' regions flanking the *TcRad51* ORF were  
199 PCR amplified and cloned on either side of the hygromycin phosphotransferase ORF (Fig. 1A).  
200 Several attempts to obtain homozygous mutants of *TcRad51* were done without success,  
201 suggesting the protein might be essential for *T. cruzi*. PCR and sequencing analysis permitted us  
202 to verify that one allele of *TcRad51* was disrupted in the hygromycin-selected clones (*TcRad51* -/+)   
203 (Fig. 1B and Supplementar Figure1). To assess whether the deletion of one allele of *TcRad51*  
204 affected the protein level, we performed western blot analysis on un-irradiated cells and cells 24  
205 hours following ionising radiation (Fig. 2). The TcRad51 protein level was increased in wild type  
206 cells 24 hours after treatment. However, there was no clear induction of TcRad51 in *TcRad51* -/+  
207 cells following exposure to ionising radiation.

#### 208 *2. The level of TcRad51 affects T. cruzi growth following gamma irradiation*

209 Regis-da-Silva and colleagues (2006) [6] demonstrated that TcRad51 overexpression increases  
210 the efficiency of the repair of shattered chromosomes caused by gamma radiation, permitting the  
211 TcRad51-overexpressing cells to overcome the growth arrest earlier than wild type cells. To  
212 examine this further, we tested if decreased levels of TcRad51 would affect the level of  
213 recombination in *T. cruzi*. We compared the *TcRad51* *-/+* knockout clones and wild type cells after  
214 exposure to 500 grays of gamma radiation (Fig. 3). Despite presenting similar growth rates in the  
215 absence of radiation-induced DNA damage, the cells presented distinct patterns of growth  
216 following exposure to gamma radiation. Immediately after irradiation, the wild type cells and  
217 *TcRad51* *-/+* cells ceased dividing. Compared to the wild type cells, the *TcRad51* *-/+* cells  
218 demonstrated a considerable delay in growth recovery, beginning to increase in concentration only  
219 fourteen days after gamma irradiation (Fig. 3). These data demonstrate that haploinsufficiency of  
220 *TcRad51* results in increased sensitivity of cells to gamma radiation.

### 221 *3. Kinetics of TcRad51 localisation following gamma radiation exposure*

222 To investigate the kinetics of TcRad51 activity during DSB repair in *T. cruzi*, we determined the  
223 intracellular location of TcRad51, at different time points after exposure to gamma radiation, in wild  
224 type, TcRad51-overexpressing and *TcRad51* *-/+* cells. Figure 4 illustrates the progressive  
225 accumulation of TcRad51 protein in the nucleus of wild type cells, with discrete foci detectable at  
226 very early time points (1–4 h). To quantify this, the fluorescence signal was measured in the  
227 nucleus of parasites at each time point analysed (Fig. 5). The Rad51 signal reached its highest  
228 level after 24 hours in wild type cells (Fig. 4 and 5A). In contrast, there was a delay in TcRad51  
229 protein accumulation in the nucleus of *TcRad51* *-/+* cells following irradiation, with the maximum  
230 signal only apparent after 48 hours (Fig. 5A and B). In addition, the fluorescent signal never  
231 reached the level of fluorescence seen in wild type cells. On the other hand, TcRad51-  
232 overexpressing cells demonstrated greater fluorescence intensity prior to irradiation compared with  
233 wild type cells (Fig. 5B), but the levels were similar following irradiation. Taken together, these data  
234 suggest that altering the level of TcRad51 affects the kinetics of localisation of TcRad51 in the  
235 nucleus after damage, indicating that Rad51 localisation and concentration are important to  
236 effective DNA repair and cell growth recovery.

237 4. *TcRad51* does not mediate resistance to DNA cross-linking agents

238 In addition to its role in double-strand break repair, Rad51 permits the restart of blocked replication  
239 forks [31]. In order to complete replication, cells must overcome replication fork barriers, such as  
240 secondary structures in DNA or cross-links caused by treatment with genotoxic agents such as  
241 cisplatin and UV light. To determine if *TcRad51* has a role in these processes, wild type cells,  
242 *TcRad51*-overexpressing cells and *TcRad51* *-/+* cells were treated with increasing doses of UV  
243 light and cisplatin (Fig. 6 and 7A). All of the cell lines demonstrated similar survival curves after  
244 both treatments, demonstrating that *TcRad51* does not play a pivotal role in the resistance to  
245 agents involved in the generation of intra- or inter-strand DNA cross-link damage in *T. cruzi*.  
246 Similarly, *T. brucei* wild type and *TbRad51*-knockout cultures also demonstrated the same  
247 resistance to UV [5] and cisplatin (Fig. 7B), indicating that *T. brucei* Rad51 is also not crucial in the  
248 repair of cross-linked DNA.

249 5. *TcRad51* is involved in the repair of oxidative lesions

250 Hydrogen peroxide can generate different oxidative lesions on DNA, including DSBs [32]. These  
251 lesions can be formed by oxidation through the aborted repair of primary DNA lesions or through  
252 stalled replication forks. Because *TcRad51* appears to not be involved in the repair of cross-linked  
253 DNA, we examined the contribution of *TcRad51* to the cellular response to oxidative stress. To  
254 address this issue, wild type cells, *TcRad51*-overexpressing cells and *TcRad51* *-/+* cells were  
255 treated with different doses of hydrogen peroxide, and the survival rate was compared 48 hours  
256 following treatment. As shown in figure 8A, *TcRad51*-overexpressing parasites had increased  
257 resistance to hydrogen peroxide when compared with wild type parasites, whereas the *TcRad51* *-*  
258 */+* cells were more sensitive. In the presence of 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 24% of the wild type cells survived  
259 compared with 64% of the *TcRad51*-overexpressing cells and 7% of the *TcRad51* *-/+* cells. These  
260 results suggest that *TcRad51* can mediate resistance to hydrogen peroxide. *TbRad51*-knockout *T.*  
261 *brucei* cells were also more sensitive to oxidative lesions than wild type cells; following treatment  
262 with 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4% of *TbRad51*-knockout cells survived, whereas 20% of the wild type cells  
263 survived (Fig. 8B).

264

## 265 4. Discussion

266 In this paper, we demonstrate that TcRad51 acts in response to different DNA damage–inducing  
267 agents in *T. cruzi*, an organism that diverged early from other eukaryotes in basic biological  
268 processes such as transcription and mitochondrial genome organisation [33, 34]. The present  
269 results, using heterozygous knockouts to reduce the TcRad51 level, together with previous results  
270 obtained with using cells overexpressing TcRad51 [6], confirm that TcRad51 is involved in  
271 homologous recombination for DNA repair. Because *T. cruzi* appears to lack key proteins involved  
272 in non-homologous end joining [15], a reaction that has never been detected in either *in vitro* [16]  
273 or *in vivo* assays in other trypanosomes [10, 17], homologous recombination involving TcRad51  
274 may be the sole pathway of double-strand break repair and most likely the basis for resistance of  
275 the parasite to high levels of gamma radiation, as proposed previously [6, 25].

276 We also demonstrated using western blot analysis that the TcRad51 protein level increases  
277 following exposure to ionising radiation, a DSB-inducing agent, in agreement with our previous  
278 data [6] that demonstrated that *TcRad51* mRNA level is induced after exposure to this genotoxic  
279 agent. Furthermore, the deletion of one allele of *TcRad51* is sufficient to impair induction of the  
280 TcRad51 protein, as determined both by western blot (Fig. 2) and immunolocalisation analyses  
281 (Fig. 5).

282 In addition to causing an increase in TcRad51 protein abundance, we show that radiation  
283 treatment also causes the formation of TcRad51 nuclear foci shortly after exposure to radiation.  
284 The formation and intensity of these foci vary with time depending on how much protein is  
285 available. The most prominent difference was observed in *TcRad51*  $-/+$  cells, which had a  
286 decreased level of TcRad51 expression 24 hours after exposure to gamma radiation and also  
287 showed a delay in foci formation following this exposure. These differences most likely explain the  
288 increased delay of *TcRad51*  $-/+$  cells to overcome the impaired growth caused by exposure to  
289 ionising radiation. Therefore, the induction of TcRad51 expression in wild type cells following  
290 exposure to gamma radiation is impaired in heterozygous mutants, and this distinct expression of  
291 TcRad51 dictates the recovery of the parasite to gamma radiation. Therefore, following exposure



292 to gamma radiation, *T. cruzi* needs to have two functional alleles of TcRad51 to express the same  
293 level of TcRad51, and therefore to recover from this treatment, as wild type cells. The lack of one  
294 TcRad51 allele impairs the upregulation of Rad51 observed after treatment with gamma radiation.  
295 In contrast, the higher level of TcRad51 expression observed in TcRad51-overexpressing cells  
296 compared to wild type cells before irradiation can be correlated with faster growth after radiation  
297 exposure. Moreover, kinetics of foci formation also correlates with the results of Regis and  
298 colleagues (2006) [6], who demonstrated using PFGE analysis that TcRad51-overexpressing cells  
299 can reassemble damaged chromosomes at least 24 hours before wild type cells. Based on these  
300 data, we can conclude that the Rad51 level and location affect the kinetics of DSB repair and,  
301 consequently, parasite growth after exposure to gamma radiation.

302 In this work, we further evaluated the contribution of TcRad51 to the repair of DNA lesions caused  
303 by cross-linking agents such as UV light and cisplatin. Recent experiments have suggested the  
304 involvement of recombination in repairing DNA damage induced by these agents that are capable  
305 of blocking the replication machinery in other organisms [35-37]. Interestingly, sensitivity to UV light  
306 and cisplatin treatment was not affected by changing the expression of TcRad51, indicating that  
307 TcRad51 does not play a major role in the repair of lesions caused by these genotoxic agents.  
308 Cisplatin forms intra- and inter-strand cross-links, whereas UV light mostly generates intra-strand  
309 cross-links (primarily cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts)  
310 [38]. These lesions can cause a severe block of transcription [38, 39]. The stalling of RNA  
311 polymerase triggers the activation of the transcription-coupled repair (TCR), a subpathway of  
312 nucleotide excision repair pathways, which remove lesions located on actively transcribed genes  
313 faster than non-transcribed genes, thereby assuring high-priority repair [40]. Because *T. cruzi*, like  
314 all kinetoplastids, transcribes the vast majority of its genome in long transcripts [15], we expected  
315 that the TCR pathway would repair these lesions before HR occurred. Therefore, TcRad51 would  
316 not be involved in the repair of these types of DNA damage, explaining why TcRad51-  
317 overexpressing cells and *TcRad51*  $-/+$  mutants did not demonstrate any differences in survival  
318 when compared to wild type parasites. Similarly, studies of *T. brucei* have shown that there is no  
319 difference in the sensitivity of homozygous Rad51 mutants to UV light [5], and we extend that here

320 by examining cisplatin (Fig. 7B), indicating that Rad51 plays at most a minor role in the repair of  
321 DNA cross-links in trypanosomatids. However, further experiments are required to demonstrate the  
322 action of the TCR pathway in this process.

323 To determine the role of TcRad51 in the repair of oxidative damage, we treated TcRad51-  
324 overexpressing cells and *TcRad51*  $-/+$  cells with hydrogen peroxide. TcRad51 overexpression  
325 increased the resistance to hydrogen peroxide, whereas the deletion of one allele of *TcRad51*  
326 decreased this resistance (Fig. 8). Similar to treatment with gamma radiation, the different levels of  
327 Rad51 in the cell also resulted in differential resistance to oxidative lesion-inducing agents; in  
328 addition to the Rad51-overexpressing cells, the heterozygous Rad51 mutants also presented  
329 distinct phenotypes when treated with hydrogen peroxide. In further support of this hypothesis, null  
330 TbRad51 *T. brucei* mutants also showed increased sensitivity to oxidative damage. Hydrogen  
331 peroxide is an oxidative agent that primarily causes DNA base damage, including single-strand  
332 breaks, base loss and the generation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxoG) [41, 42]. Several  
333 studies (as reviewed by Pastoriza-Gallego and colleagues [43]) have reported that one of the main  
334 lesions produced by hydrogen peroxide, 8-oxoguanine, blocks the transcriptional machinery in the  
335 context of only a few specific DNA sequences that cause helix distortion. These lesions will be  
336 repaired through the base excision repair pathway, and because signalling to this pathway is less  
337 efficient than the TCR pathway, some lesions could be left unrepaired until the S phase, when they  
338 will block the replication fork. This stalled replication fork can be a substrate for TcRad51, which  
339 will mediate homologous recombination to aid in restarting the replication fork. This repair reaction  
340 is necessary to eliminate the lesions that impede fork progression, to avoid fork collapse and to  
341 allow forks to resume and complete chromosome replication [44, 45]. It seems likely, therefore,  
342 that TcRad51 and TbRad51 mediate resistance to oxidative damage to DNA through the repair of  
343 DNA damage during replication.

344 In summary, our results suggest that TcRad51 plays a pivotal role in *T. cruzi* genome  
345 maintenance. TcRad51, as well as TbRad51, is involved mainly in DSB repair and oxidative lesion  
346 repair. Our results also implicate *T. cruzi* and *T. brucei* HR, and Rad51, in the restart of stalled  
347 replication fork caused by oxidative lesions.

348 **Acknowledgments**

349 We are grateful to Kátia Barroso Gonçalves and Neuza Antunes Rodrigues for technical support.

350 **References**

- 351 [1] Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and  
352 double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(4): 630–670.
- 353 [2] West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell*  
354 *Biol* 4: 435–445.
- 355 [3] Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates  
356 homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation.  
357 *Nucleic Acids Res* 26(12): 2859-2864.
- 358 [4] Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in  
359 *S cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457–470.
- 360 [5] McCulloch R, and Barry JD (1999) A role for RAD51 and homologous recombination in  
361 *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev* 13(21): 2875-2888.
- 362 [6] Regis-da-Silva CG, Freitas JM, Passos-Silva DG, Furtado C, Augusto-Pinto L, Pereira MT,  
363 DaRocha WD, Franco GR, Macedo AM, Hoffmann JS, Cazaux C, Pena SD, Teixeira SM,  
364 Machado CR (2006). Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in  
365 recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol Biochem*  
366 *Parasitol* 149(2): 191-200.
- 367 [7] Gasior SL, Olivares H, Ear U, Hari DM, Weichselbaum R, Bishop DK (2001) Assembly of RecA-  
368 like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U*  
369 *S A* 98(15): 8411-8.
- 370 [8] Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51  
371 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal  
372 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 2298-302.
- 373 [9] Proudfoot C, and McCulloch R (2005) Distinct roles for two Rad51-related genes in  
374 *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res* 33(21): 6906-6919.

- 375 [10] Glover L, McCulloch R, Horn D (2008) Sequence homology and microhomology dominate  
376 chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. *Nucleic Acids Research* 36 (8):  
377 2608–2618.
- 378 [11] Renzette N, Gumlaw N, Sandler SJ (2007) DinI and RecX modulate RecA-DNA structures in  
379 *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 63(1): 103-15.
- 380 [12] Miyazaki T, Bressan DA, Shinohara M, Haber JE, and Shinohara A (2004) *In vivo* assembly  
381 and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *EMBO J* 23:  
382 939–949.
- 383 [13] Robinson NP, McCulloch R, Conway C, Browitt A, Barry JD (2002) Inactivation of Mre11 does  
384 not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *J*  
385 *Biol Chem* 277(29): 26185-9.
- 386 [14] Hartley CL, McCulloch R (2008) *Trypanosoma brucei* BRCA2 acts in antigenic variation and  
387 has undergone a recent expansion in BRC repeat number that is important during homologous  
388 recombination. *Mol Microbiol* 68(5): 1237-51.
- 389 [15] El Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwa G, Tran AN, Ghedin E,  
390 Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, et al (2005) The genome sequence of  
391 *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- 392 [16] Burton P, McBride DJ, Wilkes JM, Barry JD, McCulloch R (2007) Ku heterodimer-independent  
393 end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryot*  
394 *Cell* 6(10): 1773-81.
- 395 [17] Conway C, Proudfoot C, Burton P, Barry JD, McCulloch R (2002) Two pathways of  
396 homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 45(6): 1687-700.
- 397 [18] McKean PG, Keen JK, Smith DF, Benson FE (2001) Identification and characterization of a  
398 Rad51 gene from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 115: 209-216.
- 399 [19] WHO 2006 [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/)
- 400 [20] Tyler KM, Engman DM (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*  
401 31(5-6):472-81.

402 [21] Machado CA, and Ayala FJ (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic  
403 exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci USA 98(13):  
404 7396-7401.

405 [22] Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CH, Smith CL, Pena SDJ (1998) Probing the  
406 genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad  
407 Sci 95: 3776-3780.

408 [23] Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SM (2006) DNA metabolism and  
409 genetic diversity in Trypanosomes. Mutat Res 612(1): 40-57.

410 [24] Cerqueira GC, Bartholomeu DC, DaRocha W, Houb L, Freitas-Silva DM, Machado CR, El-  
411 Sayed NM, Teixeira SR (2008) Sequence diversity and evolution of multigene families in  
412 *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 157: 65–72.

413 [25] Takeda GK, Campos R, Kieffer J (1986) Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma*  
414 *cruzi* Experimental study in mice. Rev Inst Med Trop São Paulo 28(1): 15-18.

415 [26] Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic  
416 trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 12:93–100.

417 [27] Cross, G.A.M. 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein  
418 antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. Parasitology 71: 393–417.

419 [28] Hirumi H, Hirumi K (1994) Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. Parasitol  
420 Today 10(2):80-4.

421 [29] DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP,  
422 Levin MJ, Teixeira SM (2004) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving  
423 vectors and electroporation protocols. Parasitol Res 92(2): 113-120.

424 [30] Gomes ML, Araújo SM, Chiai E (1991) *Trypanosoma cruzi*: Growth of clones on solid medium  
425 using culture and blood forms. Mem Inst Oswaldo cruz 86: 131-132.

426 [31] Davis AP, Symington LS (2004) RAD51-dependent break-induced replication in yeast. Mol  
427 Cell Biol 24(6): 2344-51.

428 [32] Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) The interacting pathways for prevention and repair of  
429 oxidative DNA damage. Mutat Res 531(1-2): 231-51.

430 [33] Dacks JB, Walker G, Field MC (2008) Implications of the new eukaryotic systematics for  
431 parasitologists. *Parasitol Int* 57(2): 97-104.

432 [34] Aravind L, Walker DR, and Koonin EV (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and  
433 evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* 27: 1223–1242.

434 [35] Coïc E, Feldman T, Landman AS, Haber JE (2008) Mechanisms of Rad52-independent  
435 spontaneous and UV-induced mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*  
436 179(1): 199-211.

437 [36] Raaphorst GP, Li LF, Yang DP (2006) Evaluation of adaptive responses to cisplatin in normal  
438 and mutant cell lines with mutations in recombination repair pathways. *Anticancer Res* 26(2A):  
439 1183-7.

440 [37] Cox MM (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*:  
441 questions. *Annu Rev Genet* 35: 53–82.

442 [38] Mitchell DL (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in  
443 mammalian cells. *Photochem Photobiol* 48: 51–57.

444 [39] Tremeau-Bravard A, Riedl T, Egly JM, Dahmus ME (2004) Fate of RNA at a cisplatin lesion. *J*  
445 *Biol Chem* 279: 7751–7759.

446 [40] Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*  
447 411: 366-374.

448 [41] Letavayová L, Marková E, Hermanská K, Vlcková V, Vlasáková D, Chovanec M, Brozmanová  
449 J (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to  
450 DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 5:  
451 602-610.

452 [42] Stohl EA, Seifert HS (2006) *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes  
453 protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 188(21): 7645-51.

454 [43] Pastoriza-Gallego M, Armier J, Sarasin A (2007) Transcription through 8-oxoguanine in DNA  
455 repair-proficient and *Csb*(  )/*Ogg1*(  ) DNA repair-deficient mouse embryonic fibroblasts is  
456 dependent upon promoter strength and sequence context. *Mutagenesis* 22: 343–351.

- 457 [44] Kraus E, Leung WY, and Haber JE (2001) Break-induced replication: a review and an example  
458 in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8255–8262.
- 459 [45] Michel B, Flores MJ, Viguera E, Grompone G, Seigneur M, and Bidnenko V (2001) Rescue of  
460 arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8181–8188.

461 **Figure Legends**

462 **Fig. 1: Generation of *TcRad51*  $-/+$  mutants.** (A) A schematic representation of the constructs  
463 used to generate the *TcRad51*  $-/+$  mutants illustrating the *TcRad51* locus before and after  
464 integration of the cassette. The recombination of the construct during integration is mediated by the  
465 flanking untranslated region (UTR) sequence, and the Rad51 ORF is replaced by the hygromycin  
466 phosphotransferase ORF. (B) An ethidium bromide–stained gel showing the PCR products  
467 generated with the primers represented by arrows in the schematic representation. The molecular  
468 weight markers are indicated on the right of the agarose gel. C-: negative control (PCR without  
469 DNA);  $-/+$  Rad51:  $\Delta$ Rad51...hygro-transfected parasites.

470 **Fig. 2: Detection of TcRad51 protein in epimastigote extracts from wild type cultures (WT)**  
471 **and *TcRad51*  $-/+$  cells ( $-/+$  Rad51) before (0 Gy) and 24 hours after exposure to 500 Gy of**  
472 **gamma radiation.** Cell lysates were separated on SDS-PAGE, and proteins were detected using  
473 western blot with an anti-TcRad51 (1:2000) antiserum and a peroxidase-conjugated anti-IgG  
474 secondary antibody (1:10000 or 1:12000). A control showing the tubulin level was detected using a  
475 mouse anti-Tubulin (1: 12000) antiserum.

476 **Fig. 3: Growth of *T. cruzi* following gamma irradiation.** The sensitivity of wild type (WT) and  
477 *TcRad51*  $-/+$  cells ( $-/+$  Rad51 Hyg) to gamma radiation was measured. Parasites were exposed to  
478 0 Gy and 500 Gy of gamma radiation, and the parasite number was determined every 2 days. The  
479 values represent the mean of triplicates, and the error bars indicate standard deviations.

480 **Fig. 4: Rad51 immunolocalisation in *T. cruzi*.** Epimastigotes are shown before irradiation (Non-  
481 irradiated) and at different time points (1, 4, 24, 48, 72 and 96 hours) after exposure to 500 Gy of  
482 gamma radiation. The epimastigotes were stained with DAPI and an anti-TcRad51 antibody and  
483 detected using an Alexa Fluor 555–conjugated goat-anti-mouse IgG antibody. Black bar = 5  $\mu$ m  
484 and white bar = 2  $\mu$ m.

485 **Fig. 5: Fluorescence intensity of TcRad51 in the nucleus of *T. cruzi*.** (A) Wild type cultures  
486 (WT), *TcRad51*  $-/+$  cells ( $-/+$  Rad51) and TcRad51-overexpressing cells (Rad51 overexpression)  
487 are shown before irradiation (Non-irrad.) and at different times (1, 4, 24, 48 and 72 hours) after



488 exposure to 500 Gy of gamma radiation. The stars represent statistically significant differences  
489 ( $p < 0.001$ ) in the fluorescence between each time point comparing irradiated and non-irradiated  
490 parasites. (B) Wild type cultures (WT), *TcRad51*  $-/+$  cells ( $-/+$  Rad51) and TcRad51-overexpressing  
491 cells (OverRad51) are shown before irradiation (Non irradiated) and 24 hours after exposure to  
492 gamma radiation. The stars represent statistically significant differences ( $p < 0.001$ ) in fluorescence  
493 between wild type and *TcRad51*  $-/+$  or TcRad51-overexpressing cells.

494 **Fig. 6: Response of *T. cruzi* to treatment with UV light.** The sensitivity of wild type (WT),  
495 TcRad51-overexpressing cells (OverRad51) and *TcRad51*  $-/+$  cultures ( $-/+$  Rad51) to 0, 5000 or  
496 10,000 J/m<sup>2</sup> of UV light. The parasites were counted 48 hr after treatment. The values represent  
497 the mean of triplicates, and the error bars indicate standard deviations.

498 **Fig. 7: Survival following treatment with cisplatin.** (A) The sensitivity of wild type (WT),  
499 TcRad51-overexpressing (OverRad51) and *TcRad51*  $-/+$  ( $-/+$  Rad51) *T. cruzi* cultures to 25, 50 or  
500 75  $\mu$ M cisplatin. (B) The sensitivity of wild type (WT) and TbRad51-knockout ( $-/-$  Rad51) *T. brucei*  
501 cells to 1.7, 3.3 or 5.0  $\mu$ M cisplatin. Parasites were counted 48 hr after treatment. The values  
502 represent the mean of triplicates, and the error bars indicate standard deviations.

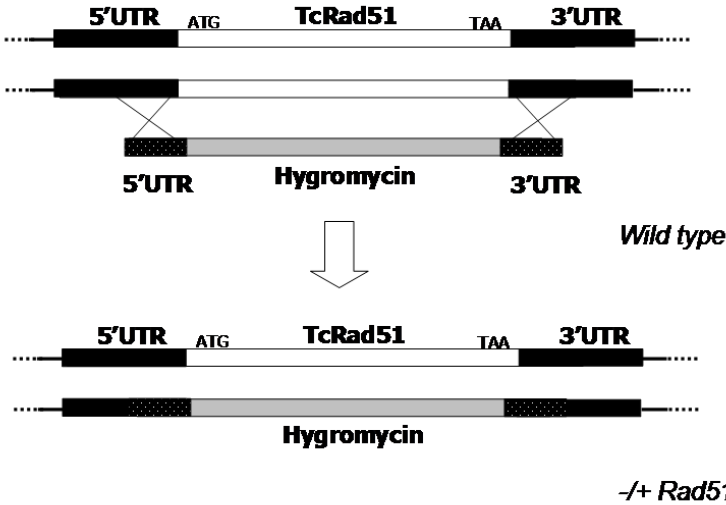
503 **Fig. 8: Survival following treatment with hydrogen peroxide.** (A) The sensitivity of wild type  
504 (WT), TcRad51-overexpressing cells (OverRad51) and *TcRad51*  $-/+$  ( $-/+$  Rad51) *T. cruzi* cultures  
505 to 150, 200 or 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) The sensitivity of wild type (WT) and TbRad51-knockout ( $-/-$   
506 Rad51) *T. brucei* cells to 50, 100 or 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parasites were counted 48 hr after treatment.  
507 The values represent the mean of triplicates, and the error bars indicate standard deviations.

#### 508 SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

509 **Fig. Sup. 1: Sequence alignment representation of Rad51 alleles.** DNA sequences of part of  
510 the two alleles of Rad51 comprising roughly 600bp upstream of TcRad51 ORF and 140pb of this  
511 ORF, besides DNA sequence of the hygromycin phosphotransferase gene. Rad51-A1 (WT) and  
512 Rad51-A2 (WT): TcRad51 alleles of wild type cells, Rad51 ( $-/+$ ):TcRad51 allele intact of *TcRad51*  $-$   
513  $/+$  cells and Rad51::Hyg ( $-/+$ ): allele of TcRad51 disrupted by a hygromycin phosphotransferase  
514 gene in *TcRad51*  $-/+$  cells. The Red box indicates a region upstream the sequence of the vector  
515 used that demonstrate the presence of the two alleles in the *TcRad51*  $-/+$  cells. The black box

516 shows the beginning of TcRad51 ORF and the green box the beginning of Hygromycin  
517 phosphotransferase ORF.

FIGURE 1 A)



B)

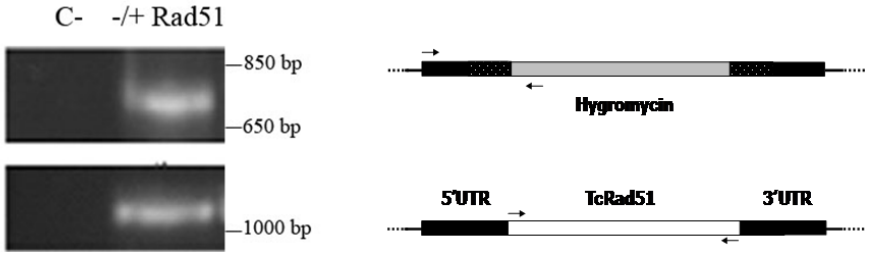


FIGURE 2

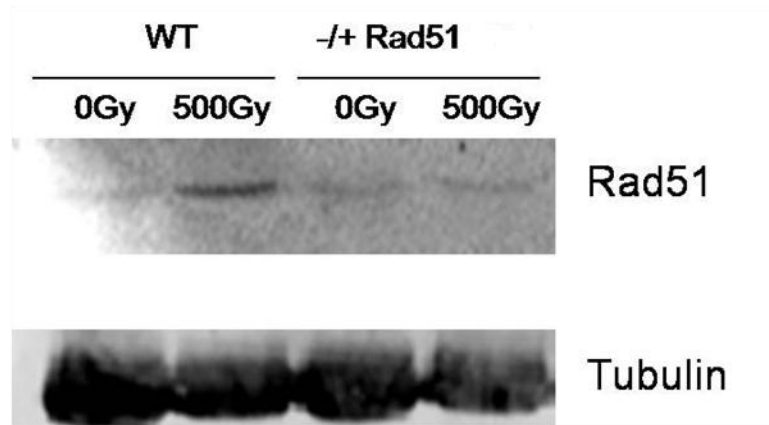


FIGURE 3

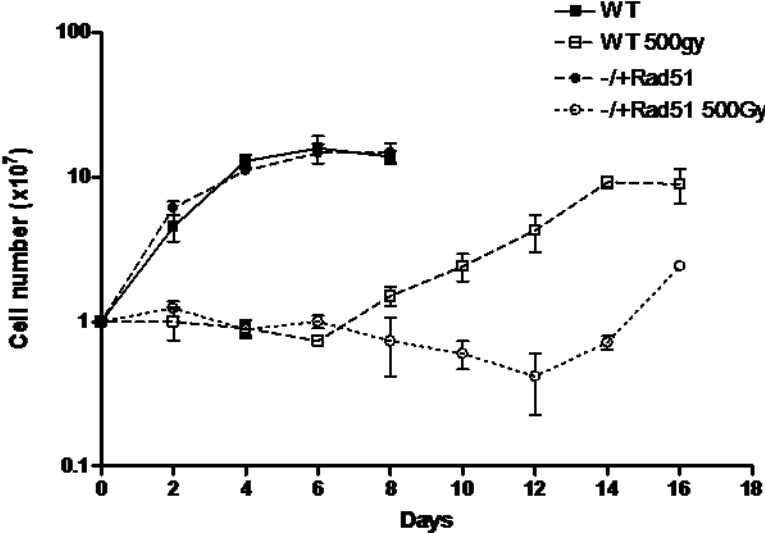


FIGURE 4

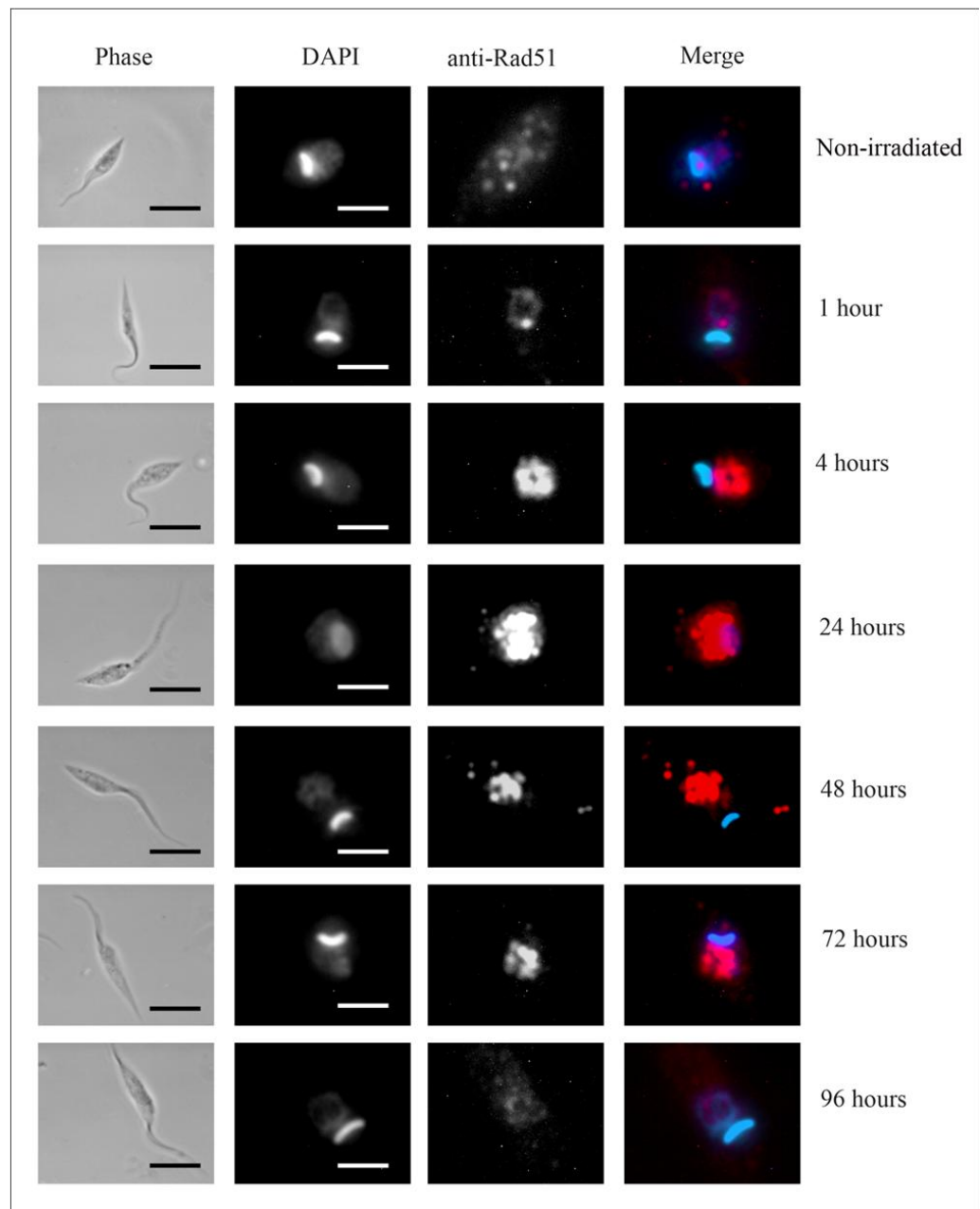


FIGURE 5

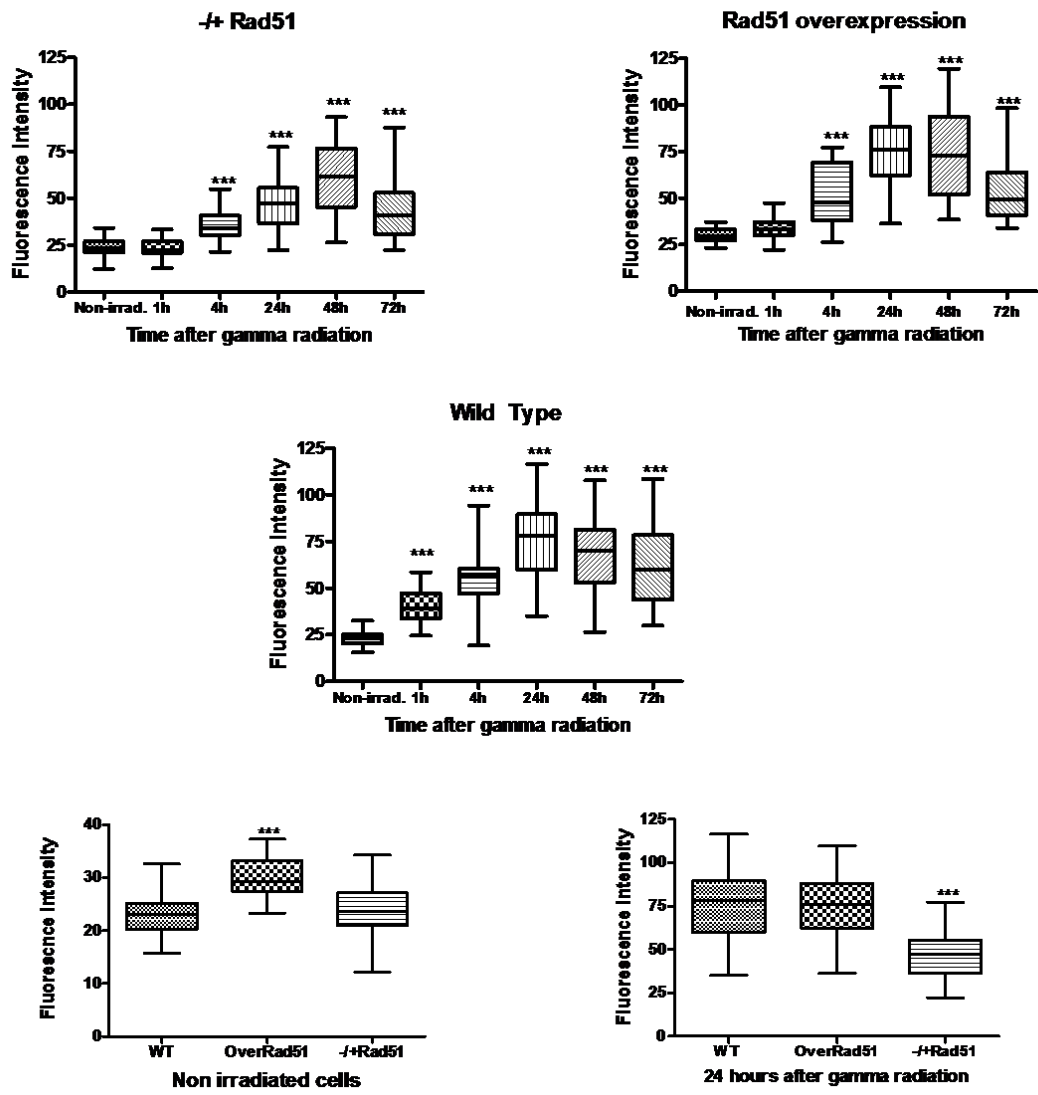


FIGURE 6

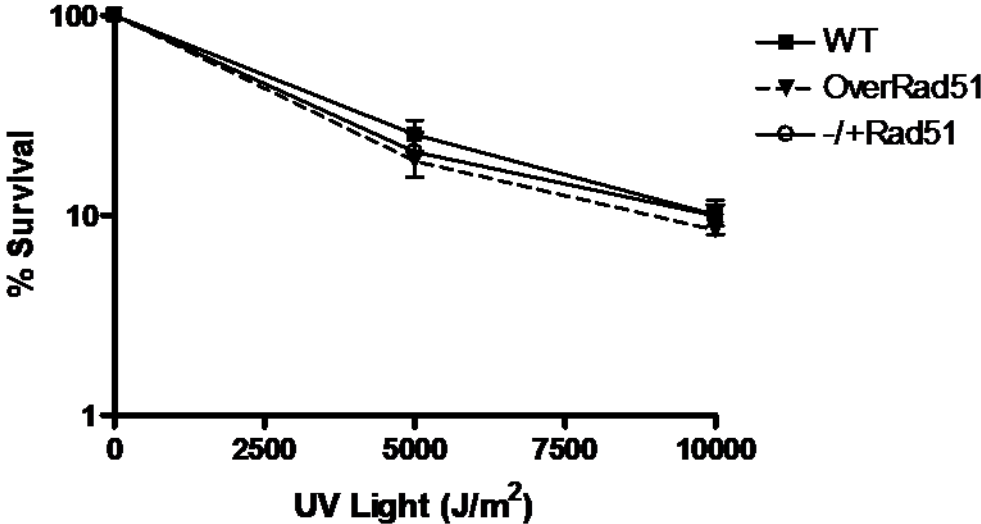




FIGURE 7

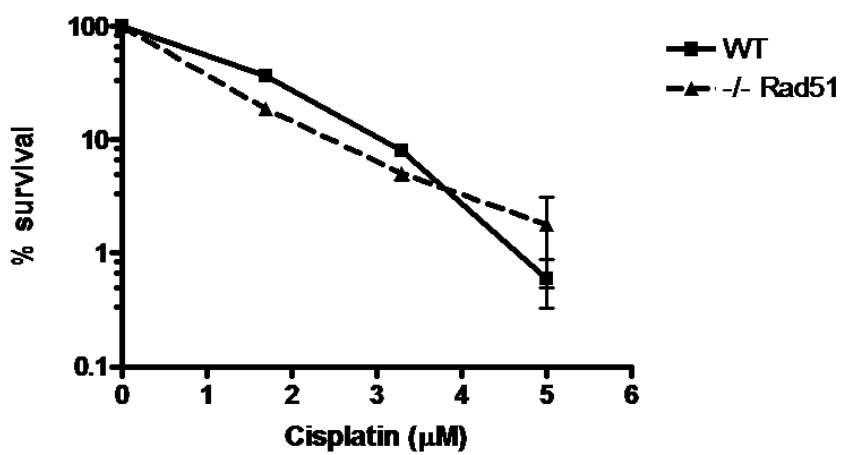
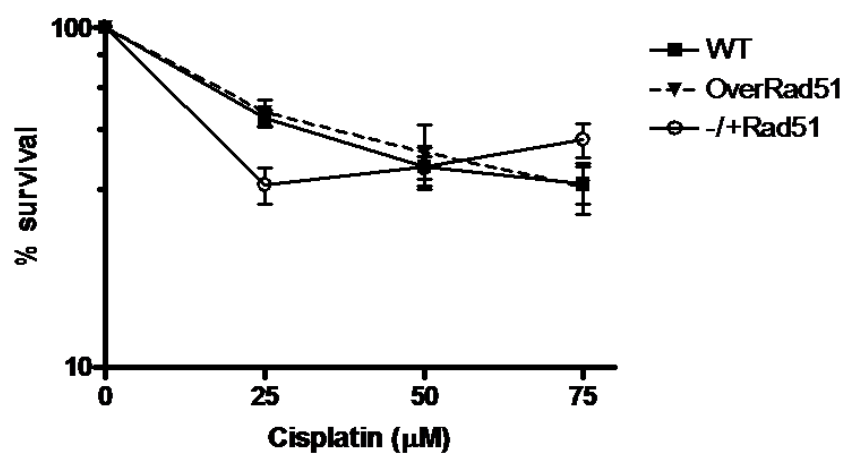


FIGURE 7

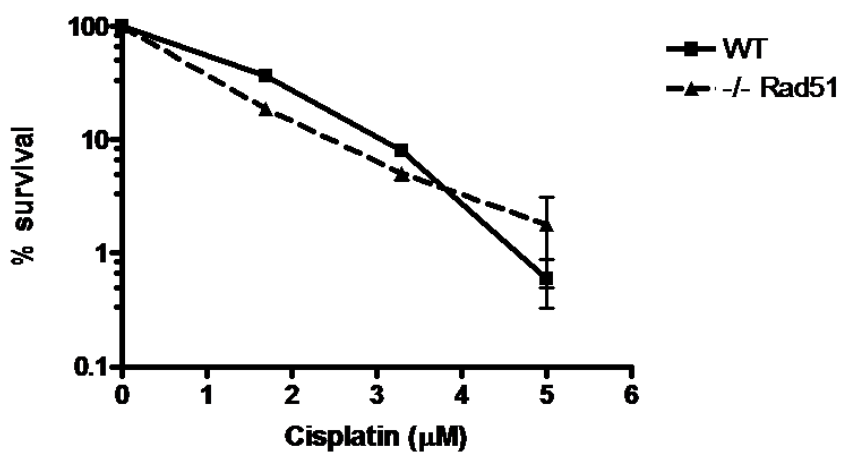
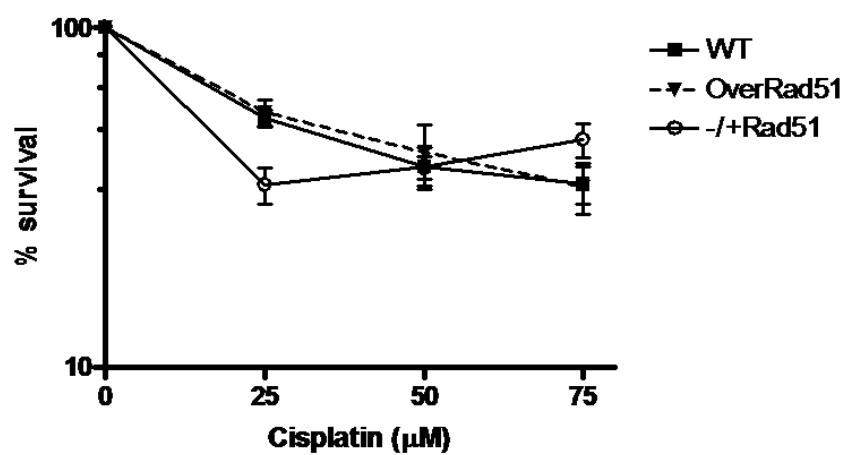
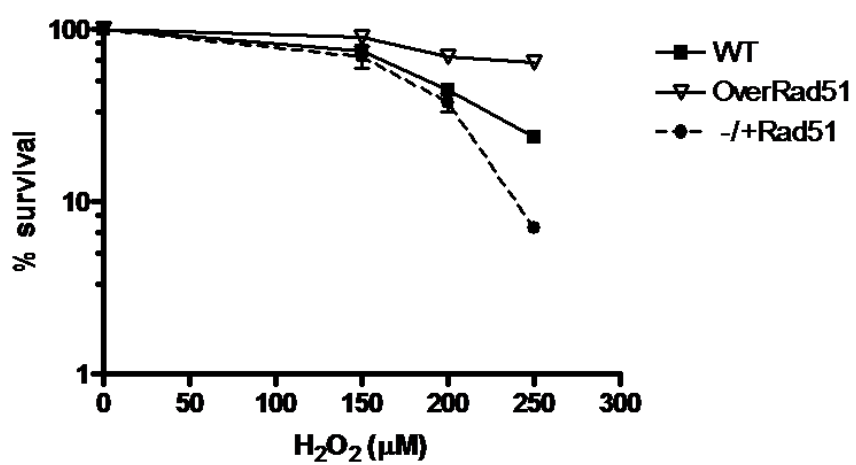
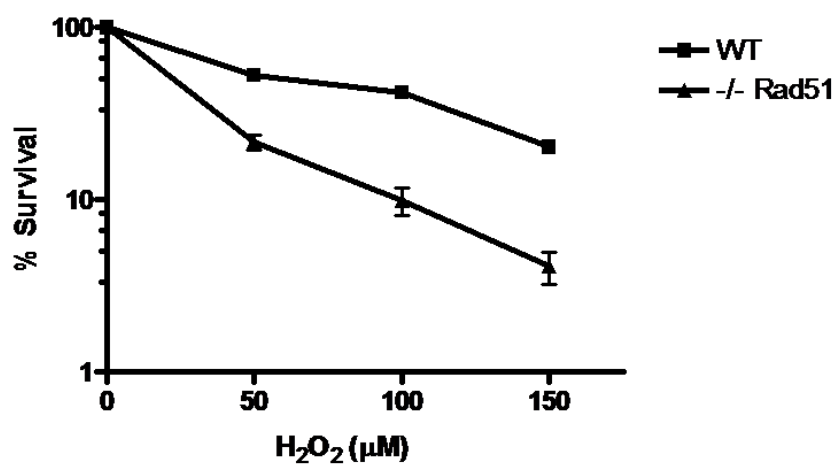


FIGURE 8

A)



B)



Supplementar FIGURE 1

