

MINISTERIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Estudo do papel do gene TcRad51 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Por

Selma da Silva Santos

Belo Horizonte
2018

TESE

DSC – IRR

S. S. SANTOS

2018

SELMA DA SILVA SANTOS

Estudo do papel do gene TcRad51 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Orientadores: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta IRR/FIOCRUZ-MINAS

Dr. Carlos Renato Machado ICB/UFMG

Coorientadora: Dra. Luciana Andrade ICB/UFMG

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fiocruz-Minas como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular

Belo Horizonte
2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S237e
2018

Santos, Selma Silva

Estudo do papel do gene TcRad51 na infecção por Trypanosoma cruzi/Selma da Silva Santos. – Belo Horizonte, 2018.

XII, 128 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 74-86

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde na Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Trypanosoma cruzi/isolamento & purificação 2 Trypanosoma cruzi/metabolismo 3 Recombinação Genética I. Título. II. Murta, Silvana Maria Fonseca (Orientação) III Machado, Carlos Renato (Orientação) IV Andrade, Luciana (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

SELMA DA SILVA SANTOS

Estudo do papel do gene TcRad51 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fiocruz-Minas como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta IRR/FIOCRUZ-MINAS – Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Carlos Renato Machado ICB/UFMG – Orientador/Presidente

Prof^a. Dra. Camila Carrião Machado Garcia UFOP – Titular

Prof^a Dra. Renata Guerra Sá UFOP – Titular

Prof^a Dra. Laila Alves Nahum IRR/FIOCRUZ-MINAS - Titular

Prof^a Dra. Alessandra A. Guarneri IRR/FIOCRUZ-MINAS - Titular.

Prof^a Dra. Taís N. De Sousa IRR/FIOCRUZ-MINAS - Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 18/12/2018

Dedico este trabalho aos meus pais
Valdemar e Maria e a meus irmãos
Sergio e Sonia. Os únicos que
compreendem completamente sua
importância.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, porque sem ele nada podemos fazer.

Nem obrigada por me aceitar como orientada sem nem me conhecer! Obrigada pelo apoio e confiança no decorrer deste trabalho. O seu otimismo e curiosidade científica foram os grandes alicerces desse trabalho.

A minha meiga orientadora Silvane Murta pelo carinho e atenção que sempre dedicou a mim no decorrer deste trabalho, pelos seus ensinamentos, por ter aberto as portas do LPCM para a realização de parte dos experimentos.

À Luciana, pelo exemplo de dedicação, competência, rigor científico, pela disponibilidade para discutir os resultados.

Aos três cada um a sua maneira, muito obrigada por não deixar que eu desistisse, essa etapa esta chegando ao fim graças ao apoio e confiança de vocês!

Ao Dr. Sérgio Pena, à Dra. Gloria Franco e à Dra. Andréia Macedo pelas sugestões e críticas a este trabalho.

A toda a galera do LGB, pela convivência sempre agradável nestes anos, pelas boas risadas.

Aos queridos integrantes do grupo de reparo de DNA, que me receberam tão bem. Bruno o “filhinho” do Nem sempre disposto a ajudar nos experimentos, obrigada por tudo! Hellida menina atenciosa, obrigada pela companhia nos congressos. A ex- integrante Ceres que sempre esteve disposta a ajudar e a dar conselhos, muito obrigada pela ajuda, pelo apoio e palavras de encorajamento. A doce Mari exemplo de dedicação e responsabilidade. Ao simpático e atencioso Pedro pelas conversas, por ter me ensinado a fazer os experimentos de infecção de células. A Isa pela companhia em alguns experimentos que não deram certo, mas eu realmente agradeço pelas boas risadas! A querida Dani, que me ajudou muito, obrigada por me ensinar a trabalhar com *T. cruzi*, a fazer as curvas, por sempre estar disposta a me ajudar, quando eu precisava.

Ao querido Policarpo do LPCM, que me ajudou em todos os experimentos *in vivo*, obrigada sem sua ajuda eu não queria conseguido trabalhar com tantos animais!

Aos amigos que fiz em BH, em especial o Felipe que é mais que um amigo, é quase um irmão, que sempre me ajudou e esteve presente nos bons e maus momentos durante esses anos. Ao Rodrigo, que aturou minha chatice e nervosismo, no decorrer deste trabalho.

As agencias financiadoras: CNPq, Howard Hughes Medical Institute e Fapemig

Agradecimentos especiais

Aos meus pais Valdemar e Maria, meus exemplos, que sempre estiveram comigo em todos os momentos da minha vida, que sempre me ajudam a realizar os meus sonhos, me dando apoio em todos os sentidos. Meu irmão Sergio, um exemplo de pessoa lutadora e responsável, obrigada pela ajuda sempre! Minha irmãzinha Sonia, minha caçulinha que sempre me surpreende com sua inteligência e maturidade, obrigada pelo apoio. Esta realização não é so minha ela é nossa!

Resumo

O gene TcRad51 apresenta uma importante função no reparo de quebras duplas no DNA, lesões oxidativas e na recombinação homóloga. Com o objetivo de investigar a importância da recombinação homóloga durante a infecção, parasitos mutantes foram gerados a partir do tipo selvagem clone CL Brener de *Trypanosoma cruzi*. Esses mutantes superexpressam o gene Rad51 (Rad51+) ou apresentam apenas uma cópia desse gene (heminocaute Rad51-/+). Formas tripomastigotas do tipo selvagem e parasitos mutantes foram utilizados em ensaios de infecção com o objetivo de estudar a invasão do parasito e replicação intracelular em fibroblastos embrionários murinos imortalizados e macrófagos humanos. O mutante que superexpressa Rad51 apresentou aumento da multiplicação intracelular após 48 e 96 horas de infecção quando comparado com células de tipo selvagem. Por outro lado, os mutantes heminocautes apresentam baixa multiplicação intracelular, quando comparado com os outros dois grupos. Em uma segunda etapa do projeto investigamos a infecção de fibroblastos murinos, com essas mesmas linhagens previamente expostas a 500 Gy de radiação gama. Após a radiação os parasitos conseguem infectar, no entanto, eles não conseguem completar o ciclo celular dentro dos fibroblastos nas primeiras 96h após a infecção. O acompanhamento da infecção com as culturas irradiadas revelou que o primeiro grupo a apresentar as formas tripomastigotas no sobrenadante foi a cultura infectada com cepas TcRad51+, depois de alguns dias, apareceu no WT e com mais alguns dias, na infecção com a cepa Rad51-/+ . No estudo da epimastigogênese após a radiação gama, obtivemos um resultado semelhante ao experimento anterior, o primeiro grupo após incubação com LIT a aparecer foi formas epimastigotas de TcRad51+, e depois de alguns dias, essas formas foram observadas nos outros grupos. Nos experimentos “*in vivo*” foi observado um atraso, no pico de parasitemia do superexpressor de Rad51, mas este foi mais alto, quando comparado com o WT. No Rad51-/+ não foi observado um pico de parasitemia definido, e este se manteve baixo por todo o período de acompanhamento. A porcentagem de cura dos animais infectados com WT e TcRad51-/+ tratados com Benzonidazol (BZ) foi alta (>85%), enquanto naqueles infectados com TcRad51+ foi de apenas 50%. Estes resultados indicam que a proteína Rad51 e a recombinação homóloga exercem uma função relevante no processo de infecção *in vitro* e *in vivo* do *T. cruzi*.

Palavras-chaves: Infecção, *Trypanosoma cruzi*, Recombinação

Abstract

The TcRad51 gene has an important role in the repair of DNA double-strand breaks (DSB), oxidative lesions and in the homologous recombination. In order to investigate the importance of homologous recombination during *Trypanosoma cruzi* infection, mutant parasites were generated from the wild-type *T. cruzi* CL Brener clone. These mutants overexpress the Rad51 gene (Rad51+) or they have only one Rad51 gene copy (hemiKnockout -/+ Rad51). Wild-type and mutants parasites trypomastigotes forms were used in infection assays to investigate parasite invasion and intracellular replication into immortalized murine embryonic fibroblasts and macrophages. The mutant that overexpressed Rad51 had an increase in intracellular multiplication after 48 and 96 hours of infection when compared with wild-type cells. On the other hand, the hemiknockout mutant -/+ present low intracellular multiplication compared to other two groups. In a second part of this project, we investigated the *T. cruzi* infection in murine fibroblasts, with these same parasite lines exposed to 500 Gy gamma radiation. After radiation, the parasites are able to infect, however, they are not able to complete the cell cycle inside of the fibroblasts 96h after infection. The follow-up of the cultures infected with irradiated parasites, showed that the TcRad51+ mutant was the first group to present trypomastigote forms in the supernatant, after few days appeared parasites in WT-infected cultures and after that appeared parasites in the Rad51-/+ infected cultures. In epimastigogenesis analysis after gamma radiation, we obtained a similar result to experiment described above, the first group after LIT incubation to appear epimastigote forms was the TcRad51+ mutant, and after a few days these forms were also observed in the other groups. The "in vivo" experiments were observed a delay in the parasitemia peak of the Rad51 overexpressor parasites, but this peak was higher than that observed to the WT. In Rad51-/+ mutant was not observed a defined parasitemia peak, and this peak remained low along all period evaluated. The percentage of cure of the animals infected with WT and TcRad51-/+ and treated with benznidazole (BZ) was high (> 85%), while in the infected mice with TcRad51+ mutant was only 50%. These results indicate that the RAD51 protein and the homologous recombination have relevant function in the *in vitro* and *in vivo* *T. cruzi* infection process.

key-words: Infection, *Trypanosoma cruzi*, Recombination.

Índice de Figura

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2: Modelo esquemático resumindo a grande variedade de proteínas envolvidas no processo de interação entre os parasitos e a célula do hospedeiro mamífero	25
Figura 3: Recombinação homóloga em eucariotos	30
Figura 4: Os níveis de expressão de TcRad51 estão relacionados ao crescimento intracelular do <i>T. cruzi</i> em células de fibroblastos.....	50
Figura 5: Número de células infectadas pelas linhagens WT, TcRad51-/+ e TcRad51+ após 30 minutos de incubação	50
Figura 6: Os níveis de expressão de TcRad51 estão relacionados ao crescimento intracelular do <i>T. cruzi</i> em células de macrófagos	52
Figura 7: Resposta de <i>T. cruzi</i> ao estresse oxidativo	53
Figura 8: experimento de infecção dos mutantes de <i>T. cruzi</i> para o gene Rad51 irradiados em fibroblastos.....	55
Figura 9: Análise do número de parasitos livres no sobrenadante de cultura de fibroblastos infectados com os mutantes de <i>T. cruzi</i> para o gene Rad51 irradiados	56
Figura 10: Epimastigogênese nas linhagens de <i>T. cruzi</i> , WT, TcRad51-/+ e TcRad51+ irradiadas ou não com radiação gama.....	58
Figura 11: Parasitemia de camundongos suíços infectados com as linhagens de <i>T. cruzi</i> , WT, TcRad51-/+ e TcRad51+.....	60
Figura 12: Mortalidade dos animais infectados com os parasitos <i>T. cruzi</i> , WT, TcRad51-/+ e TcRad51+.....	61

Índice de Tabela

Tabela 1: Porcentagem de sobrevivência dos camundongos no decorrer do tempo por linhagens..... 62

Tabela 2: Resultado da análise das hemoculturas feitas com o sangue de camundongos infectados com os parasitos WT, TcRad51+ ou tcRad51-/+ e posteriormente tratados com BZ..... 63

Abreviaturas

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

BSA: Albumina de soro bovino

BZ: Benzonidazol

DNA: Acido desoxirribonucléico

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

HR: *Homologous Recombination* – Recombinação Homóloga

H₂O₂: Peroxido de hidrogênio

LIT: *Liver Infusion Tryptone*

mRNA: RNA mensageiro

NHEJ: *Non-Homologous End Joining* – União das extremidades não homólogas

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

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

RNA: Acido ribonucléico

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

rRNA: RNA ribossômico

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

SFB: Soro Fetal Bovino

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

TcRad51+: Linhagem que superexpressa a proteína Rad51

TcRad51-/+ : Linhagem heminocautada para o gene Rad51

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

WHO: *World Health Organization*

WT: *Wild Type* – Tipo Selvagem

Sumário

1. Introdução	13
1.1 Doença de Chagas	13
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.3 Patologia da doença de chagas	19
1.4 O tratamento da doença de chagas	20
1.5 O processo de invasão celular	22
1.6 Recombinação homóloga (HR)	26
1.7 Rad51 e a recombinação em tripanossomatídeos	31
1.8 Rad51 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcRad51)	34
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. Metodologia	38
3.1. Cultura e diferenciação dos parasitos epimastigotas.....	38
3.2. Cultura de células e parasitos tripomastigotas	39
3.3. Experimentos de infecção <i>in vitro</i>	40
3.4. Imunofluorescência	42
3.5 Expressão de Rad51 após o tratamento com peróxido de hidrogênio	43
3.5.1 Preparo dos extratos celulares	43
3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	44
3.5.3 Ensaio de <i>Western Blotting</i>	45
3.6. Diferenciação do <i>T. cruzi</i> após radiação ionizante	45
3.7. Experimentos de infecção <i>in vivo</i>	46
3.8 Tratamento dos camundongos infectados.....	47
3.9. Análise experimental	47
4. Resultados	49
4.1. A Superexpressão de Rad51 aumenta a multiplicação intracelular do <i>T. cruzi</i>	49
4.2 Alterações no nível de TcRad51 altera o processo de epimastigogênese “ <i>in vitro</i> ”	57
4.3. Análise das curvas de parasitemia de camundongos infectados com linhagens da cepa CL Brener superexpressor de Rad51 e heminocaute para	

Rad51	58
4.4 Superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência ao Benzonidazol in vivo.....	62
5. Discussão	64
6. Conclusões	73
7. Referências Bibliográficas.....	74
8. Anexos.....	87
8.1 CEUA.....	88
8.2: The in vivo and in vitro roles of Trypanosoma cruzi Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions	89
8.3: The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in <i>Trypanosoma cruzi</i>	115

1. Introdução

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* que infectam mamíferos, incluindo os seres humanos (Chagas, 1909). Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico sanitarista Carlos Chagas que descreveu o agente etiológico, seu ciclo de vida, os vetores, os principais reservatórios e os mecanismos de infecção, bem como as manifestações clínicas agudas (Chagas, 1909). Segundo a Organização Mundial de Saúde, ela representa um importante problema de saúde pública na América Latina, por causa da morbidade e mortalidade apresentada pelos portadores da doença (Howard *et al.*, 2014). De acordo com dados atualizados em 2017, a Organização Mundial da Saúde estimou a existência de 6 a 7 milhões de indivíduos infectados por *T. cruzi* na América Latina.

Atualmente, a doença de Chagas é endêmica em 21 países latino-americanos (Cucunubá *et al.*, 2016). Causando infecção crônica em 8 a 14 milhões de pessoas na América Latina (Costa *et al.*, 2017) e levando à morte cerca de 12.000 pessoas por ano aproximadamente (Cucunubá *et al.*, 2016). Além disso, essa doença é a principal causa de cardiomiopatia na América Latina (Traina *et al.*, 2017). Dados demográficos de 2010 revelaram uma prevalência da infecção por transmissão vetorial na Bolívia igual a 6,1%, na Argentina a 3,6%, no Paraguai a 2,1%, no Equador a 1,3%, em El Salvador a 1,2% e na Guatemala a 1.2% (WHO, 2015).

Em 2000, as Nações Unidas incluíram a doença de Chagas entre as 13 doenças tropicais negligenciadas no mundo. Nesse grupo de doenças, as condições crônicas e incapacitantes são ainda mais importantes que a mortalidade associada (Hotz *et al.*, 2006), contribuindo na manutenção das condições precárias de vida.

Em 2006, o Brasil foi formalmente declarado livre da transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*, o principal vetor doméstico nos países da América do Sul (Schofield *et al.*, 2006). Entretanto a incidência da doença vem aumentando na região amazônica, isso se deve, principalmente, ao

desmatamento e migrações, assim como pela forma alternativa de transmissão, oral por alimentos contaminados (Coura *et al.*, 2002; Prata, 2001).

Inicialmente a infecção chagásica era preferencialmente de áreas rurais. No entanto, o panorama foi modificado pelos movimentos migratórios rurais para as regiões urbanas ocorridos na América latina nas décadas de 70 e 80. O transporte do vetor junto aos pertences pessoais, durante o êxodo rural, também favoreceu a formação do ciclo urbano, uma vez que o vetor é capaz de se adaptar a novos ambientes (Carrasco *et al.*, 1990; Dias, 2007; Moncayo, 2003). O conjunto destes dois fatos mudou o padrão epidemiológico estabelecido para a doença que passou de uma condição rural, para uma doença urbana. Além da transmissão vetorial há outras vias como: transmissão congênita, por transfusão de sangue, transplantes de órgãos, alimentos contaminados e acidente de laboratório (Brasil, 2016).

A transmissão do *T. cruzi* por via oral se deve a ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com as fezes ou mesmo com os triatomíneos silvestres infectados. Na última década, esta forma de transmissão tem tido maior relevância epidemiológica, sobretudo em áreas que possuem um forte controle da transmissão vetorial, como determinadas regiões da América Latina, especialmente na Amazônia (Rueda *et al.*, 2014). Vários surtos de doença de Chagas humana adquirida oralmente foram relatados no Brasil, Argentina e Colômbia, sendo o maior deles em 2007 na Venezuela, com um total de 103 casos agudos, 80% dos quais eram crianças (Liu; Zhou, 2015).

Nos diversos surtos não foram encontrados o sinal de Romaña ou de qualquer ponto externo de entrada do *T. cruzi*, mas sintomas agudos simultâneos de doença de Chagas em membros da mesma família ou comunidade foram relatados (Cielo; Machado; Belkisyolé, 2017). Quanto aos surtos ocorridos no Brasil, há indícios dos alimentos como veículos de contaminação, estando entre eles caldo de cana-de-açúcar, água, açaí e sopa contaminada com triatomíneos infectados ou suas fezes (Shikanai-Yasuda; Carvalho, 2012).

A transmissão do *T. cruzi* por transfusão de sangue tem grande expressão em países não endêmicos, deixando assim de ser evidente apenas na América Latina. Isso é devido ao aumento da emigração de pacientes

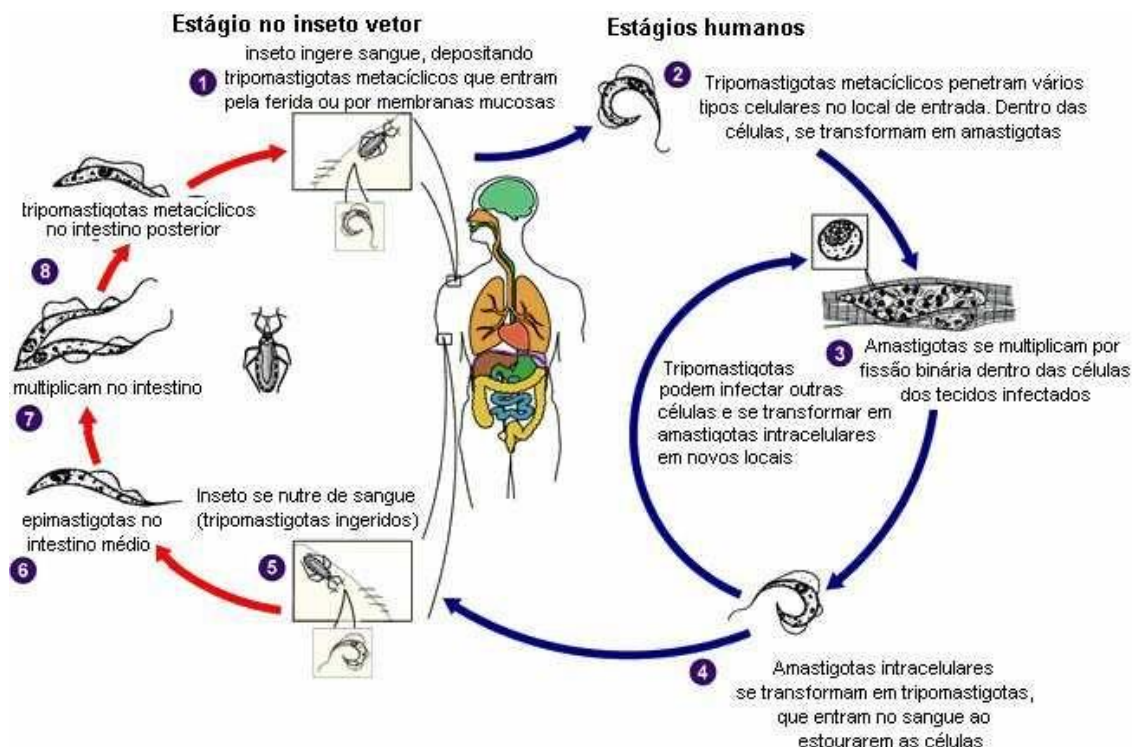
portadores da doença de Chagas para os países sem o vetor (Coura, 2015). A maioria dos pacientes com doença de Chagas é assintomática e, por não saber de sua condição, pode doar sangue, representando elevado risco de transmissão transfusional para países endêmicos e não endêmicos, como Europa, em particular os países do Sul, Espanha e Itália, onde a imigração de latino-americanos é maior (Blumental *et al.*, 2015). Visando evitar a propagação da doença, medidas de rastreio rigoroso dos doadores de sangue devem ser instituídas. Estimativas apontam que nos Estados Unidos pelo menos 300.000 novos casos da doença de Chagas tenham ocorrido entre pessoas de países latino-americanos (Miguel *et al.*, 2017). No Brasil, o controle dos bancos de sangue através de uma rigorosa triagem clínica, permitiu que a prevalência média estimada de sorologia reagente para *T. cruzi* entre candidatos à doação de sangue passasse de 8,3%, em 1950, para 0,18%, em 2010 (Dias *et al.*, 2016). Observa-se redução significativa dos riscos da transmissão transfusional graças às ações de controle das atividades hemoterápicas, além do controle vetorial, que permitiu a redução da prevalência de doadores infectados (Ferreira; Silva, 2006).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), protozoário da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Uma característica marcante desta ordem é a presença do DNA mitocondrial, conhecido por kDNA ou DNA do cinetoplasto, que está organizado dentro de uma mitocôndria única e alongada (Myler, 1993). Este parasito compreende um conjunto de populações altamente heterogêneas, as quais circulam na natureza entre homem, vetores e reservatórios. Seu ciclo de vida (Figura 1) envolve mais de um estágio morfológico distinto (Kollien *et al.*, 2000). Os insetos hematófagos (sub-família Triatominae) são responsáveis pela transmissão da doença de Chagas para os hospedeiros mamíferos. Após o repasto sanguíneo, estes insetos depositam suas fezes contendo as formas tripomastigotas metacíclicas do protozoário próximo ao orifício usado para a sucção no hospedeiro. Existem mais de 100 espécies de insetos triatomíneos

no continente americano e apenas algumas são responsáveis pela manutenção do ciclo selvagem da doença. No Brasil, os vetores mais importantes para a doença de Chagas são: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* (Kollien *et al.*, 2000).

A entrada das formas metacíclicas do *T. cruzi* por lesões na pele ou através de mucosas resulta na posterior invasão de células do hospedeiro, tais como macrófagos, fibroblastos e células musculares estriadas e lisas (Andrade ; Andrews, 2005). Após a invasão celular as formas tripomastigotas são englobadas no vacúolo parasitóforo, onde são internalizadas, permanecendo um período, até se diferenciarem na forma amastigota (Andrade & Andrews, 2005) sendo posteriormente liberadas. Essa forma é responsável pela proliferação intracelular do parasito (Tyler & Engman, 2001; Andrade & Andrews, 2005). Após alguns ciclos de replicação, estas se diferenciam novamente nas formas tripomastigotas, que são liberadas, podendo atingir a corrente sanguínea após a ruptura celular. Devido a sua motilidade, as formas tripomastigotas são capazes de infectar outras células ou tecidos, fechando o ciclo quando um triatomíneo fizer seu repasto sanguíneo.



Fonte: (Cohen e Gurtler 2001)

FIGURA 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Durante o repasto sanguíneo, os triatomíneos depositam fezes contaminadas com a forma tripomastigota metacíclica na pele ou mucosa dos mamíferos (1). Os tripomastigostas metacíclicos atravessam a pele lesada ou mucosa, penetram nas células e se diferenciam em amastigotas (2) essas formas se replicam no citosol por divisão binária (3). Após vários ciclos de replicação, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são liberadas no sangue, podendo re-infectar outras células (4). Ao se alimentar do sangue humano, o triatomíneo ingere os tripomastigotas (5), presentes no sangue, que se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do inseto (6), se multiplicam (7) e transformam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior (8), completando o ciclo.

Evidências obtidas por marcadores de DNA, tais como genes de RNA ribossômico (rRNA) e de mini-exon (Souto *et al.*, 1996), perfil de isoenzimas (Tibayrenc e Ayala, 1988), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) (Souto *et al.*, 1996) e análises filogenéticas do gene rRNA 18S (Kawashita *et al.*, 2001) indicaram que as populações de *T. cruzi* poderiam ser agrupadas em duas grandes linhagens filogenéticas, denominadas: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Anônimo 1999). Através de estudos realizados nos últimos anos foi sugerido que a variabilidade genética presente entre as cepas do grupo II é maior que aquela encontrada entre as cepas do grupo *T. cruzi* I (Brisse *et al.*, 2001; Buscaglia *et al.*, 2003; Mathieu-Daude *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008). Com base em estudos

epidemiológicos conduzidos em doze estados brasileiros, foi concluído que *T. cruzi* I predomina no ambiente silvestre, ao passo que *T. cruzi* II prevalece no ambiente doméstico (Zingales *et al.*, 1998). Análises utilizando diferentes marcadores sugeriram a existência de uma terceira linhagem independente de

T. cruzi (Freitas *et al.*, 2006). Esses autores sugeriram que aconteceu a evolução das atuais linhagens desse parasito, em que pelo menos três grupos ancestrais teriam existido (*T. cruzi* I, II e III) Brisse *et al.*, 2000, utilizando análises de isoenzimas e RAPD, propuseram a subdivisão do taxon *T. cruzi* em seis linhagens ou DTUs (Discret Taxonomic Units) I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, sendo o DTU I correspondente à linhagem *T. cruzi* I e o DTU IIb correspondente à linhagem *T. cruzi* II. As sublinhagens IIa, IIc-e incluem as cepas híbridas e aquelas pertencentes ao zimodema 3. Posteriormente, em um “Encontro Satélite” ocorrido durante a Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, em Búzios, foi adotada a subdivisão das cepas do *T. cruzi* em seis principais grupos ou DTUs denominado Tc-I a Tc-VI (Zingales *et al.*, 2009). Nessa nomenclatura TcI corresponde ao *T. cruzi* I e TcII ao *T. cruzi* grupo II ou DTU IIb, enquanto que o Tc III corresponde ao *T. cruzi* III. Os demais grupos correspondem aos perfis híbridos das cepas do *T. cruzi*. O clone CL Brener, proveniente da cepa CL (isolada de *T. infestans* no Rio Grande do Sul) foi o clone referência usado no projeto genoma do *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005). Este clone recebeu este nome em homenagem ao Prof. Zigman Brener (Instituto René Rachou - Fiocruz/Belo Horizonte) e foram isolados a partir de formas tripomastigotas sanguíneas obtidas de camundongos infectados com a cepa CL que foram posteriormente clonadas em meio sólido ágar sangue e LIT (Zingales *et al.*, 1997a). O clone é híbrido e algumas evidências indicam ser um mosaico de genes de *T. cruzi* II e *T. cruzi* III (Pedroso e Cupolillo, 2003; Sturn *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004; Elias *et al.*, 2005). Na nova classificação, o clone CL Brener pertence ao grupo de *T. cruzi* VI (Zingales *et al.*, 2009).

As diferenças genótípicas entre as cepas do *T. cruzi* se traduzem em diferenças fenotípicas tais como: diferenças na morfologia; tropismo tissular; virulência; associação com vetores e suscetibilidade a drogas (Vargas; Pedroso; Zingales, 2004; Elias *et al.*, 2005).

1.3 Patologia da doença de Chagas

O *T. cruzi* pode indicar seu ponto de entrada no corpo humano através do surgimento de lesão inflamatória, o chagoma de inoculação – formação cutânea ligeiramente saliente, arredondada, eritematosa, de consistência firme, com alguns centímetros de diâmetro e geralmente indolor, também conhecido como sinal de Romana. A fase aguda é marcada por alterações teciduais degenerativas e inflamatórias locais, devidas à intensa multiplicação local do parasito (Laranja, 1953). Manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia são também observadas nessa fase. Em cerca de 90% dos casos, as manifestações clínicas duram algumas semanas ou meses, regredindo espontaneamente. Nos demais pacientes, alterações cardíacas ou esofagianas podem permanecer além deste período e levar ao óbito. Em alguns casos, a fase aguda pode ainda apresentar-se como assintomática (Dutra *et al.*, 2005).

A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas e pela diminuição da parasitemia que caracteriza a forma indeterminada da doença de Chagas. Uma grande parcela dos pacientes que entram na fase crônica permanece assintomática e a doença só é detectada através de exames laboratoriais.

O critério para o diagnóstico da forma indeterminada, adotado pela Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, prevê indivíduos assintomáticos, aqueles que apresentam evidências sorológicas e/ou parasitológicas de infecção pelo *T. cruzi*, entretanto o eletrocardiograma e o estudo radiológico (esôfago e cólon) dentro dos limites normais. Todavia, parasitos têm sido detectados por técnicas especiais às quais têm possibilitado a comprovação de material antigênico ou de partes do genoma do *T. cruzi* (PCR *in situ*) em algumas destas lesões (Higuchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1993). Estes resultados mostram que as discretas lesões focais, encontradas no coração em portadores da forma indeterminada, são parasito-dependentes.

A forma cardíaca é a mais importante forma de limitação ao doente chagásico e a principal causa de morte. Pode apresentar-se sem

sintomatologia, mas com alterações eletrocardiográficas, como uma síndrome de insuficiência cardíaca progressiva, insuficiência cardíaca fulminante, ou com arritmias graves e morte súbita. Seus sinais e sintomas são palpitação, falta de ar, edema, dor no peito, tosse, tonturas, desmaios, acidentes embólicos, arritmias e sopro cardíaco. As formas tripomastigotas largas apresentam tropismo pelas fibras musculares lisas, esqueléticas e cardíacas, ocasionando as síndromes clínicas, onde em 30% dos casos o coração é afetado. Nesses casos, as manifestações clínicas são edema dos membros, cansaço, arritmias cardíacas, insuficiência circulatória e morte súbita por falência cardíaca (Rey, 2001). A miocardite chagásica é diferenciada pela presença do parasito nas fibras musculares e infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos no miocárdio. As reações de hipersensibilidade envolvendo o miocárdio induzem a um infiltrado intersticial principalmente perivascular. Esta reação inflamatória pode causar graves danos ao organismo (Brasileiro *et al.*, 2004).

A forma digestiva caracteriza-se por alterações ao longo do trato digestivo, com consequentes alterações da motilidade e morfologia no nível do trato digestivo, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns. Os sinais e sintomas mais frequentes do megaesôfago são disfagia (dificuldade para engolir), regurgitação, dor de estômago ou dor no peito, dor para engolir, soluço, excesso de salivação, emagrecimento. O megacólon se caracteriza pela constipação intestinal (instalação lenta e insidiosa) e distensão abdominal. Os exames radiológicos são importantes no diagnóstico da forma digestiva. Já na forma mista o paciente pode ter associação da forma cardíaca com a digestiva e também apresentar mais de um mega (Brener, 2000).

1.4 O tratamento da doença de Chagas

O tratamento da doença de Chagas teve início nas décadas de 60 e 70 com o uso dos compostos nitroaromáticos heterocíclicos, Nifurtimox (NFX—comercializado pela Bayer), mas atualmente descontinuado no Brasil, e Benzonidazol (BZ), (comercializado pelo LAFEPE, Brasil) (Boiani *et al.*, 2008; www.lafepe.pe.gov.br). No entanto, estas drogas possuem baixa eficácia de

cura principalmente na fase crônica da doença (apenas 8%) (Sales-Junior *et al.*, 2017). O NFX e BZ são efetivos na cura da infecção na fase aguda, levando 76% dos pacientes tratados à cura parasitológica (Cançado, 2002). Em crianças de baixa idade com infecção crônica recente foi demonstrado cerca de 55,8% de cura após o tratamento com Benzonidazol (Andrade *et al.*, 1996). Além da baixa eficácia, ambos compostos apresentam diversos efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, vômito, emagrecimento, leucopenia, neuropatia e dermatopatia alérgica (Rassi & Luquetti, 1992).

O BZ é um composto do grupo dos nitroheterocíclicos, que são caracterizados por possuírem um grupo nitro ligados a um anel aromático. Estes compostos funcionam como pro-drogas e devem ser metabolizados para ter efeitos citotóxicos (Wilkinson *et al.*, 2008). O grupo nitro do BZ é reduzido para grupo amino através da ação de nitroreduases, com a formação de vários radicais livres e metabólitos eletrofílicos (Maya *et al.*, 2006; Wilkinson *et al.*, 2008). O radical nitroânion produzido sofre ciclagem redox com o oxigênio molecular, sendo parcialmente reduzido e podendo regenerar a droga (Mason e Holtzman, 1975; Maya *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação do Benzonidazol ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que o Benzonidazol inibe o crescimento do *T. cruzi*. Provavelmente, metabólitos reduzidos produzidos a partir dessa droga se ligam covalentemente aos componentes do parasito como DNA, lipídeos e proteínas, inibindo o seu crescimento (Días de Toranzo *et al.*; 1988). Por outro lado, a ação do nifurtimox se deve ao radical nitroreduzido do fármaco que pode reagir com o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido (O_2^-) e este produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do peróxido de hidrogênio com o ânion superóxido produzindo radical hidroxila (OH^-), um dos radicais de baixa massa molecular mais tóxico (Tappel, 1973). Ele se liga ao DNA e proteínas do parasito, danificando-o. Um trabalho do nosso grupo sugere que o mecanismo que ação do BZ é devido à oxidação do *pool* de nucleotídeos e quando essas bases são incorporadas ao DNA erroneamente, levam a formação de lesões no DNA, quebras duplas e estas por sua vez, quando não são reparadas levam à morte do parasito (Rajão *et al.*, 2013).

Porém, tanto o Nifurtimox quanto o Benzonidazol não são considerados ideais para o tratamento da doença de Chagas pelos seguintes motivos: apresentam sérios efeitos colaterais; não são eficazes apresentando baixa taxa de cura principalmente na fase crônica da doença; precisam ser administrados por longos períodos de tempo sob supervisão médica; e as diferentes cepas do parasito apresentam diferentes graus de suscetibilidade ao tratamento com esses compostos. Estas limitações destacam a urgência para a identificação e desenvolvimento de novos compostos tripanosomicidas para substituir os compostos utilizados atualmente (Romanha *et al.*, 2010).

Recentemente outras abordagens quimioterapêuticas para o tratamento da doença de Chagas estão sendo pesquisadas. Dentre elas, podemos citar: uso de inibidores da biossíntese de esterol, combinação de drogas no tratamento experimental da doença de Chagas, estudo de enzimas- alvo de interesse para a quimioterapia da doença de Chagas como tripanotiona redutase, cisteína protease, DNA topoisomerase e outras abordagens (Urbina, 1999; Coura & Castro, 2002; Sales-Junior *et al.*, 2017).

1.5 O processo de invasão celular

O *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro mamífero (Brenner, 1973). Ao contrário de outros agentes infecciosos que dependem de fagócitos profissionais para o sucesso da infecção, as tripomastigotas são capazes de invadir ativamente tanto células fagocíticas profissionais quanto células fagocíticas não profissionais. Dentre as células fagocíticas profissionais, os macrófagos residentes dos tecidos periféricos são o primeiro alvo do parasito no local da infecção inicial (Muñoz-Fernández *et al.*, 1992). No entanto, estas células podem conter a infecção através do controle dos parasitos pela produção de espécies reativas de oxigênio (Bogdan & Röllinghoff, 1999). Sendo assim, as células não fagocíticas são o principal alvo deste parasito.

Durante a invasão da forma tripomastigota de *T. cruzi*, alguns eventos que ocorrem na célula hospedeira são fundamentais para a infecção, tais como o aumento de cálcio citosólico (Moreno, *et al.*, 1994), pulsos do nucleotídeo

cíclico, cAMP (Rodriguez *et al.*, 1999), ativação de proteínas tirosina quinase (Yoshida, *et al.*, 2000), de fosfatidil-3-quinase (Woolsey, *et al.*, 2003), recrutamento de lisossomos (Fernado & Andrade, 2012) ou ação de tirosina fosfatases, mostrada pela redução da fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas (Zhong, *et al.*, 1998) ou ainda pelo bloqueio da infecção pelo tratamento da célula hospedeira com inibidores de tirosina fosfatase (Gallo, *et al.*, 2011). Há ainda o envolvimento de proteínas estruturais e de metabolismo na célula hospedeira, que contribuem para o desenvolvimento intracelular do parasito (Caradonna, *et al.*, 2012, Genovesio, *et al.*, 2011, Nagaiyothi *et al.*, 2012).

A interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira tem início com a adesão do parasito à superfície celular. Entretanto, nem todos os parasitos que estão aderidos a essa superfície permanecem fixos a ela. O grau de adesão varia de acordo com a cepa do parasito, com a forma evolutiva (nem todas as formas evolutivas aderem na célula hospedeira) e com o tipo celular (Alves *et al.*, 2007).

O processo de adesão e invasão das células hospedeiras pelo parasito envolve a participação de diversas moléculas de superfície do parasito ancoradas em moléculas GPI (glicosilfosfatidilinositol) de membrana (Previato *et al.* 1985; Yoshida *et al.* 1989; Schenkman *et al.*, 1993; revisão em Acosta Serrano *et al.*, 2001). Formas tripomastigotas de *T. cruzi* não sintetizam ácido siálico (Schauer *et al.*, 1983), mas possuem glicoproteínas de ação enzimática localizadas na superfície da membrana denominadas transialidades, que são responsáveis pela transferência deste ácido siálico da célula hospedeira para proteínas do tipo mucinas, ligadas por âncora de GPI, na superfície do parasito (Previato *et al.*, 1985; Yoshida *et al.*, 1989; Schenkman *et al.*, 1993; revisão em Acosta Serrano *et al.*, 2001). Este fenômeno é importante para o processo de interação com a célula hospedeira e interiorização do parasito (Rodriguez *et al.* 1999).

O processo de interação entre o *T. cruzi* e a célula hospedeira pode ser dividido em três estágios distintos: adesão e reconhecimento, sinalização e internalização (Schenkman, Diaz, *et al.* 1991; Ciavaglia *et al.* 1993; Tardieux *et al.* 1994; Rodríguez *et al.* 1999; Andrade & Andrews 2004; Fernandes *et al.*

2011). A internalização do parasito tem início com o contato e adesão de moléculas do parasito com a célula hospedeira, a partir do qual podem ser desencadeados processos de sinalização intracelular, tanto do lado do parasito quanto do hospedeiro (Yoshida *et al.* 1989; Ruiz *et al.* 1993; Yoshida *et al.* 1997; Burleigh *et al.* 1997; Ruiz *et al.* 1998; Favoreto Jr. *et al.* 1998; Scharfstein *et al.* 2000). Várias moléculas do parasito, como por exemplos podem a gp82 e a gp85 participam deste processo de adesão e sinalização celular (Figura 2).

O processo de internalização do parasito depende do recrutamento e fusão de lisossomos para o sítio de interação do parasito com a célula hospedeira e é essencial para a formação de um vacúolo parasitóforo estável (Andrade *et al.*, 2004). Em seguida, o vacúolo parasitóforo é rompido, liberando os parasitos no citosol da célula hospedeira, onde estes podem se diferenciar na forma replicativa amastigota (revisado por Andrade *et al.*, 2005). O *T. cruzi* apresenta então uma diferença marcante em relação a outros patógenos intracelulares, pois ele não evita a fusão lisossomal e reside por um tempo significativo dentro deste vacúolo antes de escapar para o citosol (Kumar *et al.*, 2009). Várias evidências sugerem que os lisossomos fornecem não só a membrana para a formação do vacúolo, mas também o ambiente ácido que é essencial para o rompimento do vacúolo e escape do parasito para o citosol (Tardieux *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1999; Ley *et al.*, 1990). Este escape ocorre devido à secreção da proteína Tc-Tox pelo parasito, em pH baixo que é capaz de se polimerizar e formar um poro (Ley *et al.*, 1990).

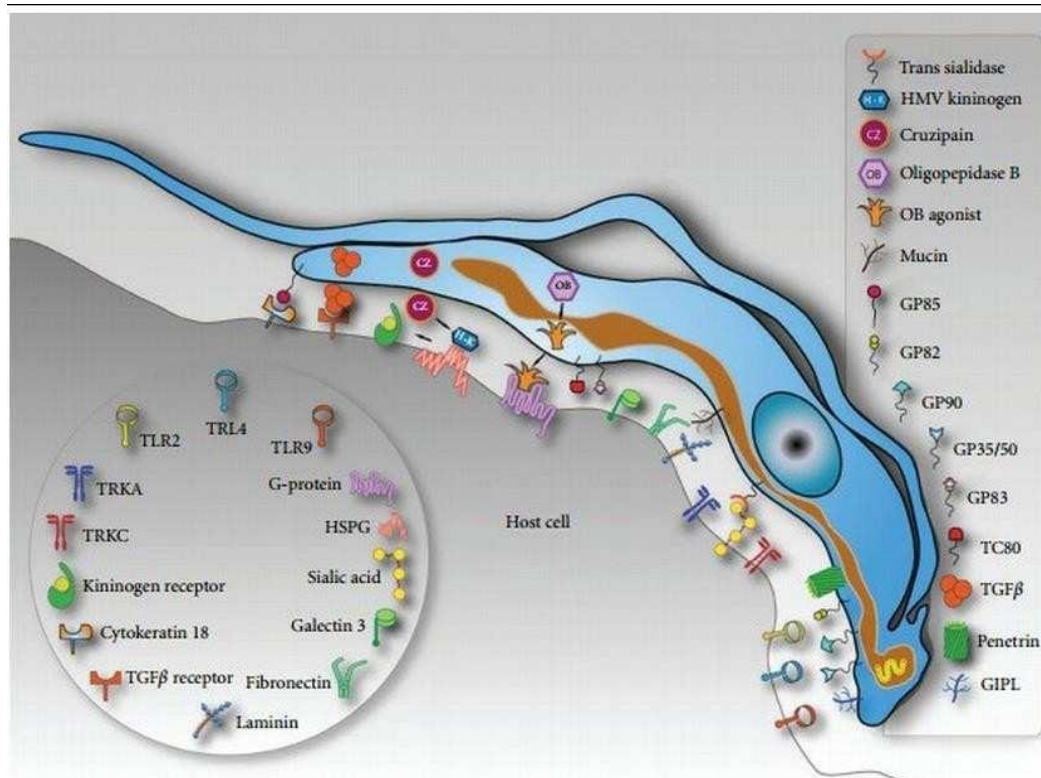


Figura 2: Modelo esquemático resumindo a grande variedade de moléculas envolvidas no processo de interação entre o *T. cruzi* e a célula do hospedeiro mamífero. Estas apresentam um grande papel no processo de adesão e sinalização celular, passos extremamente importantes para a infecção das células pelo parasita (extraído de Souza *et al.* 2010).

O *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida, com vários ambientes diferentes, nos quais ele precisa se adaptar. O estresse oxidativo encontrado em todos estes ambientes é uma das principais ameaças para a viabilidade celular do parasito (Piacenza *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2009; Rassi, 2010b; Garcia *et al.*, 2010).

No local de entrada do parasito no mamífero, macrófagos residentes estão entre as primeiras células a serem invadidas pelo *T. cruzi*. Para o estabelecimento da infecção, o parasito precisa lidar com o ataque destas células fagocíticas profissionais da resposta imune inata. Estas células respondem à invasão produzindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela NADPH oxidase (NADPHox), que pode espontaneamente formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kierszenbaum *et al.*, 1974; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992b).

O peróxido de hidrogênio é um agente oxidativo capaz de gerar 8-oxoguanina (8-oxoG) (Slupphaug *et al.*, 2003), que é mais mutagênica que letal. Este processo acontece na presença de metais como ferro e cobre, que reduzem H_2O_2 a $\cdot OH$ (radical hidroxila) por uma reação do tipo Fenton ($H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow OH + OH^- + Fe^{+3}$). Este produto da reação é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) que reage com a base guanina produzindo a 8oxoG.

Descobertas recentes (Foti *et al.*, 2012) demonstram que as lesões 8oxoG formadas no DNA de bactérias, devido ao estresse oxidativo, podem resultar em quebras duplas no DNA, quando as etapas do processo de reparo não são concluídas. As quebras duplas são potentes indutores de efeitos genotóxicos (quebras cromossômicas) e morte celular. Estas lesões são reparadas principalmente pela via de recombinação homóloga.

1.6 Recombinação homóloga (HR)

Em resposta aos vários tipos de danos no DNA que podem ocorrer, os organismos apresentam vias de reparo de DNA para preservar a integridade genômica. As quebras duplas no DNA (DSBs) estão entre as formas mais perigosas de danos ao DNA. As DSBs não reparadas resultam em células que podem sofrer apoptose ou senescência, e o processamento incorreto destas pode levar à instabilidade genômica e à carcinogêneses. As quebras duplas podem ser geradas por uma variedade de meios, incluindo as fontes endógenas como as espécies reativas de oxigênio geradas pelo próprio metabolismo celular e os erros associados à replicação, além de fontes exógenas como a radiação ionizante e os agentes quimioterápicos (Hoeijmakers, 2001).

Os dois principais mecanismos para o reparo de quebras duplas são: reparo por recombinação homóloga (HR) e o reparo de extremidades não coesivas (NHEJ), as quais são livres de erros e suscetível de erro, respectivamente. Em eucariontes mais simples, a HR é o caminho predominante, enquanto em mamífero a NHEJ é a principal via de reparo de quebras duplas. O uso de NHEJ e HR também depende da fase do ciclo celular. NHEJ ocorre predominante em G₀/G₁, enquanto que HR ocorre

durante o final de S e G2. O sistema de reparo NHEJ liga duas pontas de quebras duplas, sem o requerimento de sequências homólogas entre as pontas do DNA, ao contrário do sistema de reparo HR que utiliza a informação contida no cromossomo homólogo não danificado (Christmann *et al.*, 2003).

O sequenciamento completo do genoma de três tripanossomatídeos (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*) revelou que esses organismos possuem as principais proteínas envolvidas nos primeiros passos da HR. No entanto, a via NHEJ parece estar ausente em tripanossomatídeos. Com exceção de Mre11, Rad50, KU70 e KU80, nenhum outro fator implicado no NHEJ pôde ser identificado nesses organismos. KU70 e KU80 foram identificados em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. Estudos em *T. brucei* mostraram que esses genes atuam na manutenção de telômeros (Conway, 2002; Jansen, 2004), uma função já conhecida que é desempenhada por essas proteínas, além do NHEJ (Williams, 2003). Os mutantes de KU70 e KU80 não apresentaram maior sensibilidade a agentes danificadores de DNA, o que reforça o seu papel na manutenção do telômero e que apresentam um papel menor no reparo de DSBs, possivelmente devido à ausência de NHEJ neste organismo. As ausências mais marcantes de genes associados com o NHEJ em tripanossomatídeos são os da DNA ligase IV e XRCC4 / Lif1 (Burton *et al.* 2007).

A importância da HR é apoiada pelo alto grau de conservação desses genes em eucariotos. HR participa dos processos de 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. A recombinação meiótica ainda contribui para a diversidade através da geração de novos rearranjos entre genes. A HR também garante às células não meióticas o reparo fidedigno das DSBs que podem ser formadas como resultados do colapso da forquilha de replicação, de processamento de danos no DNA e exposição a agentes genotóxicos, como a radiação gama. Além de promover o reparo de DSBs, a HR também está envolvida na manutenção da estabilidade genômica através da manutenção de telômeros na ausência da telomerase, no reparo de *crosslinks* de DNA e no reparo de DSBs que iniciam rearranjos programados como a troca de *mating-type* em

Saccharomyces cerevisiae e recombinação V(D)J das imunoglobulinas (Gasir *et al.*, 2001; Li; Heyer, 2008; Moynahan; Jasin, 2010; San Filippo *et al.*, 2008; Symington, 2002; revisado por Krejci *et al.*, 2012).

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; revisado por Krejci *et al.*, 2012).

A recombinação tem início após a quebra de fita dupla de DNA (Figura 3). 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), a extremidade 3' dessas fitas é processada, formando uma cauda de fita simples. A cauda resultante é envolvida pela proteína de ligação à fita simples de DNA, RPA, que minimiza a formação de estruturas secundárias. Em seguida a RPA é deslocada pelo complexo Rad51/Rad52, permitindo assim o acesso da proteína 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.

Um processo limitante é a polimerização de recombinases no DNA de fita simples (ou ssDNA do inglês *single strand* DNA). Este, por sua vez, pode ser auxiliado 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 proteína Rad54 facilita a reação de troca de fita de DNA (Mazin *et al.*, 2010). Rad54 promove o pareamento do DNA homólogo, na troca de fita do DNA e ajuda também na reciclagem das recombinases, removendo-as do DNA de fita dupla antes e após a etapa de invasão de DNA (Forget, 2010). Após o

pareamento entre as sequências homólogas, a DNA polimerase é responsável pela polimerização da extremidade 3' da fita de invasão.

No processo de recombinação os passos chaves são o pareamento de DNA homólogo e a reação de troca de fitas. Eles ocorrem através da ação de recombinases, as quais são altamente conservadas e denominadas RecA em procariotos e Rad51 em eucariotos. Essas proteínas quando ligadas ao 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 homologia não for encontrada, a fita dupla é liberada. Uma vez que a homologia é localizada, há captura inicial da fita dupla e ocorre o alinhamento com a molécula de ssDNA. 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.

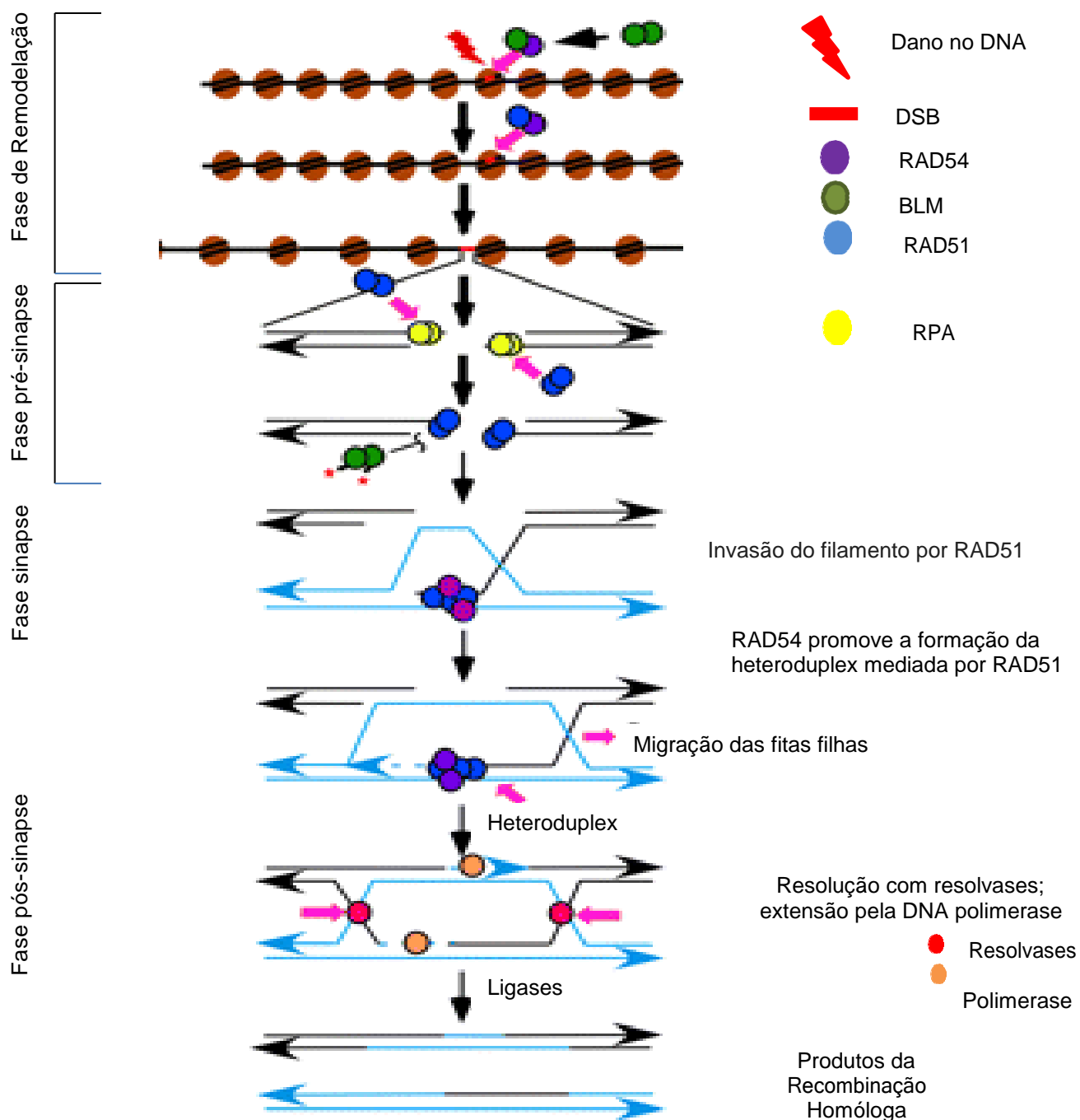


Figura 3 – Recombinação homóloga em eucariotos. A fita simples resultante do processamento da quebra de fita dupla é ocupada, inicialmente, pela proteína de ligação à fita simples, RPA. Posteriormente, RPA é substituída pela proteína Rad51, através do auxílio do complexo Rad51/BRCA2. O nucleofilamento 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)).

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; revisado por Krejci *et al.*, 2012).

A proteína Rad51 é uma das principais proteínas envolvidas na recombinação homóloga, e tem semelhanças com a proteína Rec A de *E. coli* (Ivanov *et al.*, 1997). Essas proteínas são capazes de se polimerizar sobre o DNA de fita simples formando um filamento de nucleoproteínas e buscar regiões homólogas no DNA

1.7 Rad51 e a recombinação em tripanossomatídeos

A recombinação homóloga é a principal via de reparo de DSB em eucariotos inferiores (Bhattacharyya, 2004). As proteínas que dão início ao processo de HR como Mre11, Rad50, Nsb1 e Rpa, foram identificadas no genoma do *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*. No entanto, somente Mre11 de *T. brucei* foi caracterizada. 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).

Em tripanossomatídeos foram encontrados os seguintes mediadores de recombinação homóloga: Brca2, parálogos de Rad51 e Rad54. Por outro lado, homólogos de Rad52, proteína chave da HR em leveduras, não foram encontrados nesses organismos. Entretanto, 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 importante 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, a qual não é encontrada em leveduras, seja uma das prováveis proteínas que substituiriam Rad52 de levedura em células de mamíferos e nos tripanossomatídeos. A proteína BRCA2 interage com Rad51 através das repetições BRC (Forget; Kowalczykowski, 2010; Shiji *et al.*, 2009) e sequências não relacionadas. BRCA2 de *T. cruzi* e *Leishmania* possuem duas e uma repetições BRC não idênticas, respectivamente (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 (Variant Surface Glycoprotein) (Proudfoot; Mcculloch, 2005).

As recombinases DMC1 e a Rad51 mediam o pareamento entre fitas homólogas e a reação de troca de fitas a principal etapa da HR. 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). Estudos demonstram 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), mas até o momento foi demonstrado a realização de meiose apenas em *T. brucei* (Peacock *et al.*, 2014).

A HR pode contribuir para as diferentes estratégias evolutivas encontradas nos tripanossomatídeos para criar a variabilidade genética que é necessária para a sua sobrevivência em seus hospedeiros. O *T. brucei* agente etiológico da doença do sono, transmitido através da picada da mosca Tsé-tsé, tem seu ciclo de vida no hospedeiro vertebrado caracterizado pela presença das formas tripomastigotas circulando na corrente sanguínea, fazendo com que este a todo o momento esteja exposto à intensa pressão do sistema imune (Machado; Ayala, 2001). Esses parasitos possuem em sua superfície um revestimento protetor composto por glicoproteínas denominadas glicoproteínas

de superfície variante. Ao longo da infecção, estes 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 que se localizam próximo aos telômeros. Além da VSG expressa, há mais de 1.000 VSGs inativas que são encontradas em regiões internas dos cromossomos. Estudos com este parasito indicaram que um dos mecanismos responsáveis pela troca de VSG expressa é a recombinação homóloga. Ela possibilita a translocação de uma VSG inativa para o sítio de expressão ativa. Além disso, os 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). 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. 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 desse gene para o reparo de DNA e para a recombinação homóloga.

Enquanto isso, *T. cruzi* exibe uma gama de moléculas de superfície altamente polimórficas e pode representar um arsenal útil para fugir do sistema imunológico (Machado, 2006). Alguns trabalhos têm sugerido que a HR é responsável por criar genes em mosaico de moléculas de superfície por meio da conversão de genes segmentares e por diminuir a divergência entre regiões duplicadas, como as famílias multigênicas de superfície (Cerqueira *et al.*, 2008; Bartholomeu *et al.*, 2009). Além disso, experimentos com manipulação genética mostraram que a recombinação homóloga é o principal mecanismo para a integração do DNA exógeno nesses organismos (Clayton, 1999; Barnes e McCulloch, 2007).

1.8 Rad51 de *Trypanosoma cruzi* (TcRad51)

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). O primeiro passo realizado foi a análise da sequência do gene obtida através do banco de dados TritypDB. Esta análise prediz que o TcRad51 possui apenas um gene e como esse clone CL Brener é híbrido ele tem 2 alelos. Este gene apresenta uma sequência codificante de 1116 nucleotídeos, a qual codifica uma proteína de 371 aminoácidos. As recombinases Rad51 são proteínas bastante conservadas em eucariotos, guardando ainda certo grau de similaridade com recombinases bacterianas. O alinhamento da sequência de TcRad51 com proteínas Rad51 de vários organismos revela tal conservação (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Essa proteína apresenta domínios de ligação ao DNA e ao ATP, como demonstrado em Rad51 de outros organismos. Experimentos de *Northern Blot* utilizando a cepa CL Brener do *T. cruzi* mostraram que a expressão do gene de TcRad51 foi detectada nas três formas do ciclo de vida do parasito (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Foi observado ainda que o nível de mRNA desse gene foi duas vezes mais abundante na forma amastigota. A atividade de recombinase do produto desse gene foi verificada pelo aumento de eventos de recombinação observado em células de mamífero expressando TcRad51 (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Como essa proteína é componente do reparo de quebra dupla, formas epimastigotas do *T. cruzi* foram submetidas à radiação ionizante – um agente genotóxico que causa quebras duplas no DNA. Os resultados mostraram um aumento da expressão de mRNA de TcRad51 nesses parasitos (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). A dose de radiação ionizante utilizada nesse ensaio foi 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). Em *T. cruzi* a radiação de 500 grays (Gy) não causa morte celular e os parasitos irradiados conseguem retomar o crescimento após alguns dias.

Para um melhor estudo do papel deste gene nosso grupo desenvolveu duas linhagens geneticamente modificadas de *T. cruzi*: uma que superexpressa o gene TcRad51 (TcRad51+) (Regis-da-Silva *et al.*, 2006); e outra deficiente de um dos alelos para o gene TcRad51 (TcRad51-/+) (Passos-Silva, 2010). Os parasitos Rad51+ irradiados retomam o crescimento antes dos parasitos WT (*Wild-type* – do tipo Selvagem), enquanto que os parasitos Rad51-/+ apresentam uma retomada de crescimento mais tardia (Regis-da-Silva *et al.*, 2006; Passos-Silva, 2010). Esta maior resistência à radiação gama pode ser atribuída a uma cinética de reparo de DNA mais rápida do DNA fragmentado nos parasitos Rad51+ quando comparada ao das células WT, quando analisada por eletroforese em campo pulsátil (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). A superexpressão de Rad51 em *T. cruzi* confere uma maior resistência ao tratamento com peróxido de hidrogênio e ao Benzonidazol (BZ) (Passos-Silva, 2010; Rajão *et al.*, 2014) e parasitos Rad51-/+ são mais sensíveis a esses compostos que os selvagens (Passos-Silva, 2010). Estes resultados sugerem a participação da recombinação homóloga em mecanismos de resistência ao estresse oxidativo e ao BZ. Desta forma, torna-se importante um estudo sobre a participação da proteína TcRad51 nos mecanismos de infecção de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, uma vez que o parasito precisa lidar com os danos causados pelo estresse oxidativo para estabelecer a infecção.

Além disso, recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que essa recombinase desempenha um importante papel nos eventos de troca gênica em *T. cruzi* (Alves *et al.*, 2018). Neste estudo, foi verificado que as taxas de troca gênica em epimastigotas de *T. cruzi* que superexpressam RAD51 estão aumentadas quando comparadas com células WT, sugerindo um papel dessa recombinase tanto na formação quanto na estabilização de híbridos de células fundidas em *T. cruzi* (Alves *et al.*, 2018).

Diante do que foi apresentado, surgem as seguintes questões: será que a maior resistência ao estresse oxidativo e ao BZ conferida pela superexpressão da proteína Rad51 se mantém na infecção *in vivo* e *in vitro*? Será que a proteína Rad51 pode interferir na variabilidade das proteínas de superfície? Se sim, isso interfere na infecção? Portanto, utilizando parasitos geneticamente modificados, superexpressor ou heminocaute para o gene

TcRad51, avaliamos *in vitro* e *in vivo* o papel do gene do Rad51 na infecção pelo *T. cruzi*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar o papel do gene Rad51 na infecção de *Trypanosoma cruzi in vitro* e em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a infectividade das linhagens de *T. cruzi* CL Brener selvagem (WT), superexpressor de Rad 51 (Rad51+) e heminocaute de Rad 51 (Rad51-/+) em fibroblastos murinos e macrófagos humanos;
- Analisar a infecção de fibroblasto, epimastigogênese e multiplicação celular com essas linhagens previamente submetidas à radiação gama;
- Avaliar a curva de parasitemia de camundongos infectados com essas linhagens;
- Determinar a porcentagem de cura dos camundongos infectados com essas linhagens e posteriormente tratados com Benzonidazol.

3. Metodologia

3.1. Cultura e diferenciação dos parasitos epimastigotas

Neste trabalho foi utilizado o clone CL Brener do *T. cruzi*, não modificado ou selvagem (WT *Wild-type*), proveniente do laboratório do Prof. Egler Chiari, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para gerar a linhagem que superexpressa a proteína Rad51 (TcRad51+), formas epimastigotas do clone CL Brener foram transfectadas, com o vetor pROCK_Rad51_HIGRO, contendo o gene Rad51 e um gene que confere resistência à higromicina (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Por outro lado, para obter parasitos heminocautos para o gene Rad51(TcRad51-/+), os parasitos foram transfectados com um cassete que possui o gene de resistência ao antibiótico higromicina flanqueado por 500 pb correspondentes às regiões que flanqueiam a região codificante do gene Rad51 (Passos-Silva, 2010). As formas epimastigotas dessas três linhagens foram cultivadas a 28° C em meio LIT (*Liver infusion tryptose* (0,5% de *liver digested neutralized*, 0,5% de bactotripton, 0,2% de dextrose, 0,4% de NaCl, 0,04% KCl, 0,8% de Na₂HPO₄, 20 µg.mL⁻¹ de hemina, pH 7,3) esterilizado por filtração em filtro de 0,2 µm, suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFBi), mais 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL / 10 mg/mL) (Gibco).

As formas epimastigotas foram diferenciadas para tripomastigotas metacíclicas a partir de protocolo para metaciclogênese *in vitro* descrito por Figueiredo *et al.* (2000). Este procedimento foi baseado nas condições encontradas pelo parasito no intestino do triatomíneo, que são favoráveis a metaciclogênese. As formas epimastigotas foram crescidas até atingirem a fase estacionária, em seguida purificadas por centrifugação a 1.500 g por 15 minutos a 10°C e ressuspendidas em meio TAU (*Triatomine artificial urine*, 190 mM NaCl, 8 mM tampão fosfato, pH 6,0, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂) na concentração de 5 x 10⁸ células/mL. Após 2 horas de incubação, os parasitos foram diluídos em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 0,035% bicarbonato de sódio, 10 mM L-prolina, 50 mM sódio glutamato, 2 mM sódio L-aspartato e 10 mM glicose), para uma concentração de 5 x 10⁶ células/mL, e incubados por 6 dias a 28° C em garrafas de culturas. Este meio e as condições de incubação, induzem a adesão dos parasitos ao fundo da garrafa,

como observado no intestino do hospedeiro invertebrado, e provocam a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas que ficam livres no sobrenadante. Posteriormente, as células diferenciadas foram coletadas, centrifugadas e ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para a infecção das culturas de células.

3.2. Cultura de células e parasitos tripomastigotas

Durante este trabalho, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultura celular *in vitro*. Células LLC-MK2, isoladas de epitélio de revestimento de rim de macaco *Rhesus* (gentilmente cedidas pela Dr^a. Norma Andrews/ Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, USA), foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm² (TPP, Switzerland) e meio DMEM (Gibco) contendo 4,0 g/L de glicose, 4,0 mM de glutamina e suplementado com 10% de SFBi (Gibco), mais 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL / 10 mg/mL) (Gibco), além de bicarbonato de sódio na concentração de 3,7 g/L.

Sete dias após o plaqueamento das células era realizado o repasse das mesmas, para manutenção das células, e infecção com o *T. cruzi*. Para o repasse, uma das garrafas contendo uma monocamada confluyente de células foi lavada duas vezes com solução tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*, KCl 2,667 mM; KH₂PO₄ 1,471 mM; NaCl 137,931 mM, Na₂HPO₄.7 H₂O 8,060 mM) e submetida à dissociação química por tripsina a 0,05% (Gibco). As células dissociadas foram então ressuspensas em meio DMEM com 10% de SFBi e repassadas, na proporção 1:20 (uma parte de células em suspensão para cada 20 partes de meio de cultura), para outras garrafas de 75 cm². Estas garrafas novas foram utilizadas para infecção com *T. cruzi* na semana seguinte ou novo repasse das células.

O restante das garrafas, contendo uma monocamada confluyente de células, foram infectado com 4,0 x 10⁶ tripomastigotas de cultura de células (TCTs) do clone CL Brener de *T. cruzi* WT, TcRad51(-/+) ou Rad51(+). Após a infecção, as células foram mantidas em meio DMEM contendo 2% SFBi e as mesmas concentrações de penicilina/estreptomicina e de glutamina utilizadas no meio contendo 10% de soro. O meio das células foi trocado a cada dois

dias. No sétimo dia de infecção, o meio contendo as formas tripomastigotas foi coletado de cada garrafa, transferido para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugado a 2.400 RPM por 10 minutos a 25 °C a fim de eliminar as formas amastigotas contaminantes e debris celulares, auxiliando assim a purificação das formas tripomastigotas. Após a centrifugação, os tubos foram transferidos para a incubadora a 37°C, 5% CO² por 3 - 4 horas para permitir que as formas tripomastigotas, flageladas, subissem para o sobrenadante. Por fim, o sobrenadante destes tubos foi recolhido e as formas tripomastigotas purificadas contadas em câmara de Neubauer e utilizadas nos ensaios de infecção.

Uma linhagem de fibroblastos originalmente isolados de camundongo tipo selvagens e imortalizados (gentilmente cedidas pelo Dr. Paul Saftig/Kiel Universitat - Alemanha) foi mantida em meio de cultura DMEM (Gibco) contendo os mesmos aditivos mencionados anteriormente e 10% soro fetal bovino. Estas células foram repassadas a cada dois dias na proporção de 1:10, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Todas as culturas de células foram mantidas em estufa úmida, a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ para possibilitar o tamponamento do meio de cultura.

3.3. Experimentos de infecção *in vitro*

Experimentos de infecção com fibroblastos

Para as infecções experimentais, culturas de fibroblastos, foram quimicamente dissociadas por solução de tripsina 0,05% (Gibco) a 37°C e posteriormente ressuspensas no meio em que foram cultivadas. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços (contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro) em uma densidade de $4,0 \times 10^4$ células/mL. As células foram incubadas a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas.

Para a infecção, as formas tripomastigotas das cepas WT, TcRad51+ e TcRad51-/+ foram purificadas como descrito no item 3.2 e contadas em câmara de Neubauer. A concentração dos parasitos foi ajustada de modo a obter uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 100 parasitos por célula em todos os grupos. Os parasitos foram incubados por 30 minutos com as células e, em

seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS suplementado com CaCl_2 e MgCl_2 (PBS+/+), que previne o desprendimento das células da monocamada, para a retirada de tripomastigotas livres que não foram internalizadas. Após a lavagem, adicionou-se meio de cultura novo, as células infectadas foram incubadas a 37°C com atmosfera de 5% CO_2 e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% em diferentes intervalos de tempo. Para a determinação do crescimento intracelular dos parasitos, os tempos de incubação foram 30 minutos, 24, 48, 72 e 96 horas. Para os experimentos de cinética de escape do vacúolo parasitóforo, as lamínulas foram fixadas com 30 minutos, 4, 8, 10 e 24 horas. Os ensaios com tratamento de radiação gama foram realizados seguindo o mesmo protocolo do experimento para determinação do crescimento intracelular, porém, os parasitos foram submetidos à dose de 500 Gy de radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto (^{60}Co), disponível no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - UFMG. Essa dose foi obtida através da exposição a uma taxa de $1578 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. A irradiação ocorreu antes da infecção. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos duas vezes para a confirmação dos resultados.

Experimentos de infecção com macrófagos

Para infecção experimental de macrófagos as células THP-1, foram diluídas para uma densidade de $5,10^5$ células/ml em meio RPMI suplementado com 10% de FBS. Imediatamente após a adição de monoazida de propídio (PMA) na concentração de 50 mg/ml, os macrófagos foram semeados em placas de 24 poços (contendo lamínulas de vidro redondo de 13 mm de diâmetro) e incubadas em 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 por 72 h para permitir a diferenciação. Os tripomastigotas de cultura de tecidos foram então purificados, contados e diluídos em meio RPMI, e a infecção foi realizada por 2 h em um MOI de 5. Imediatamente após a infecção por macrófagos, as células foram lavadas quatro vezes com PBS para remover parasitos extracelulares e, em seguida, fixados ou reincubados com meio por 48 e 72 h antes da fixação com metanol. As lamínulas com macrófagos acoplados foram coradas com Giemsa, e um mínimo de 300 macrófagos por lamínula foram analisados. Os resultados foram expressos como um índice de infecção (% de macrófagos

infectados versus número de amastigotas pelo número total de macrófagos). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos duas vezes para a confirmação dos resultados.

3.4. Imunofluorescência

Após a fixação das lamínulas em paraformaldeído 4%, procedeu-se com a coloração das mesmas por método de imunofluorescência adaptado de protocolos previamente estabelecidos (Tardieux *et al.*, 1992; Andrade & Andrews, 2004). Para isso, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS+/- e incubadas por 20 minutos em solução de PBS+/- e 2% de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma®) para o bloqueio de ligações inespecíficas dos anticorpos. Em seguida, para distinguir as formas tripomastigotas extracelulares dos parasitos intracelulares, as lamínulas foram incubadas por 50 minutos com anticorpo de coelho anti-tripomastigota de *T. cruzi* (gentilmente cedido pela Prof^a. Rosa Maria Esteves Arantes, Departamento de Patologia, ICB – UFMG), diluído na proporção de 1:500 em PBS/BSA. Após este período de incubação, foram realizadas três lavagens com PBS+/-/ 2% BSA para a remoção do excesso de anticorpo não ligado. As lamínulas foram marcadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-Fluor 546 (*Alexa-Fluor® 546 Goat anti-rabbit IgG (H+L)* 2 mg/mL - Invitrogen®) por 40 minutos de incubação, em câmara úmida e escura, com uma diluição de 1:250 em PBS/BSA. Em seguida, as lamínulas foram lavadas novamente por três vezes com PBS/BSA.

Com o objetivo de evidenciar os parasitos internalizados e associados à lisossomos, foi realizada a permeabilização das células através do tratamento das lamínulas com solução de PBS/BSA contendo 0,5% saponina (*Saponin from quillaja bark*, Sigma®) por 20 minutos. Após a permeabilização, as lamínulas foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-LAMP1 (uma glicoproteína lisossomal) (Hybridoma Bank - 1D4B, gentilmente cedido pela Dr^a. Norma Andrews, Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, USA) por 50 minutos. Este anticorpo foi diluído na proporção de 1:50 em solução PBS/BSA/saponina. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas três vezes com solução PBS/BSA/saponina e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de rato conjugado com Alexa-Fluor

488 (Alexa-Fluor® 488 Goat anti-rat IgG (H+L) 2 mg/mL - Invitrogen®). Neste passo, o tempo de incubação foi de 40 minutos e a diluição foi de 1:250 em solução PBS/BSA/saponina. Terminada esta incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS/BSA/saponina e três vezes com PBS+/-.

O DNA das células e dos parasitos foi marcado por 1 minuto de incubação com o corante DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen®), diluído 1:1000 em PBS+/- . As lamínulas foram lavadas quatro vezes com PBS+/- para a retirada do excesso de DAPI. Ao fim da lavagem, realizou-se a montagem em lâminas de vidro com P-fenilenodiamina (PPD) gel de montagem para fluorescência e selagem das mesmas com esmalte incolor.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Axioplan-2 (Zeiss®) com objetiva de imersão (aumento de 63x, NA = 1,25). Foram analisados 10 a 15 campos aleatórios por lamínulas, totalizando um número mínimo de 250 células. Em cada campo, foi contado o número total de células e parasitos (filtro azul, $\lambda_c = 365$ nm), o número de parasitos extracelulares (filtro vermelho, $\lambda_c = 546$ nm) e o número de parasitos associados a lisossomos (filtro verde, $\lambda_f = 450-490$ nm). A marcação realizada permitiu avaliar a eficiência de infecção de cada cepa através da razão do número de parasitos intracelulares para cada 100 células, além do crescimento intracelular das cepas pelo número de parasitos intracelulares por célula infectada. Também foi determinada a porcentagem de parasitos associados ao vacúolo parasitóforo pela co-localização com o marcador lisossomal LAMP1.

3.5 Expressão de Rad51 após o tratamento com peróxido de hidrogênio

3.5.1 Preparo dos extratos celulares

Culturas de *T. cruzi* do tipo selvagem (tratadas ou não com peróxido de hidrogênio) foram coletadas por centrifugação (2.500 g, 10 minutos) e ressuspendidas em 80 μ L de PBS/1mM MgCl₂ e 80 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, Tween 20 1%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 μ g.ml⁻¹, leupeptina 1 μ g.ml⁻¹; pH 7,4). Algumas culturas passaram pelo mesmo processo após terem sido tratadas com H₂O₂ (200 μ M) por 20 minutos em PBS (Aguiar, 2013).

As suspensões foram posteriormente sonicadas no aparelho *Fisher Scientific™ Model 505 Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific). O programa utilizado foi de 10 ciclos de 1 segundo, havendo o intervalo de 1 segundo entre eles, e 30% da amperagem máxima. Os extratos foram incubados por duas horas no gelo e centrifugados (14.000 rpm, 15 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi coletado e estocado a -80 °C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os extratos de proteína obtidos no item anterior foram submetidos à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% [Tris-HCl 1,5 M, dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,1%, persulfato de amônio 0,05% v/v e TEMED 0,01% v/v; pH 8,8]. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante, mas utilizando o tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8).

Ao volume de amostra correspondente a 30 µg de proteína foi adicionado tampão de amostra (Tris-HCl 100mM, SDS 4%, azul de bromofenol 2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 200mM; pH 6,8), obedecendo a mesma quantidade entre as amostras. O volume final das amostras contendo tampão foi completado com água. As amostras foram fervidas por cinco minutos e aplicadas no gel para separação eletroforética.

A eletroforese foi realizada a 100 volts por duas horas utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,01%; pH 8,3). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o *Rainbow* (GE Healthcare). Após a corrida, os géis em espelho foram corados em *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) por duas horas e, em seguida, descorados em solução descorante (metanol 30% e ácido acético 10%). Estes géis foram utilizados para avaliar a qualidade dos extratos utilizados.

As proteínas do extrato foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) em sistema de transferência semi-seco (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad*) à 200 mA em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%) por 30

minutos. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (PBS acrescido de *Tween* 0,05% e leite em pó desnatado 5%) sob agitação por duas horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos em PBS *Tween* 0,05% (PBS-T).

3.5.3 Ensaio de *Western Blotting*

Os ensaios de *Western Blotting* foram realizados incubando-se a membrana obtida no item anterior com o anticorpo primário sob agitação por duas horas. Nestas incubações, foram utilizados anticorpos anti-rad51 (1:1.000). Para a normalização da concentração proteica, as membranas foram incubadas com anti- α -tubulina (Sigma) (1:3.000). Todos os anticorpos foram diluídos em PBS-T e 5% de leite em pó desnatado. Após o período de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos em PBS-T.

Na próxima etapa, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase em PBS-T (1:3000) por uma hora sob agitação. O anticorpo secundário *anti-mouse* IgG (Sigma) foi utilizado nas membranas incubadas com anti-rad51 e anti- α -tubulina. Após esta incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS-T e reveladas usando o sistema *ECL Western Blotting System* (GE Healthcare). A quantificação das bandas foi realizada usando o *software* ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

3.6. Diferenciação do *T. cruzi* após radiação ionizante

Para este experimento, as formas tripomastigotas das cepas WT, TcRad51+ e TcRad51-/+ foram purificadas como descrito no item 3.2 e contadas em câmara de Neubauer. A concentração dos parasitos foi ajustada para que os três grupos estivessem numa concentração de 1.10^7 parasitos/ml. Esses parasitos foram submetidos à dose de 500 Gy de radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto (^{60}Co), disponível no CDTN/UFMG. Essa dose foi obtida através da exposição a uma taxa de 1.578 Gy.h⁻¹. Depois da radiação os parasitos foram transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL e

centrifugado a 3.000 RPM por dez minutos a 25 °C, o sedimento foi ressuspenso em LIT e colocado na estufa a 28 °C. O aparecimento de formas epimastigotas foi determinado pela contagem dos parasitos em câmara de Neubauer.

Além de serem colocados em LIT, os parasitos foram utilizados para infectar garrafas, contendo uma monocamada confluyente de fibroblastos. Os fibroblastos ($4,0 \times 10^4$ células/mL) foram infectados com $4,0 \times 10^6$ tripomastigotas de cultura de células (TCTs) do clone CL Brener de *T. cruzi* WT, TcRad51(-/+) ou Rad51(+). A concentração dos parasitos foi ajustada de modo a obter uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 100 parasitos por célula em todos os grupos. Após a infecção, as células foram mantidas em meio DMEM contendo 2% SFBi e as mesmas concentrações de penicilina/estreptomicina e de glutamina. O meio das células foi trocado a cada três dias. O aparecimento de formas tripomastigotas foi acompanhado pela coleta do sobrenadante e a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos duas vezes para a confirmação dos resultados.

3.7. Experimentos de infecção *in vivo*

Os experimentos de infecção *in vivo* foram realizados no Biotério de Experimentação (BIOTEX) do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ - MINAS). Para obtenção das formas tripomastigotas sanguíneas, as formas tripomastigotas de cultura de tecido foram purificadas, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.2, contadas em câmara de Neubauer e inoculadas em camundongos via intraperitoneal, em grupos de três animais para cada cepa. Os animais utilizados eram camundongos Suíços fêmeas, com três ou quatro semanas de idade, cedidos pelo Biotério de Produção também do IRR. Foram feitas seis passagens dos parasitos em camundongos antes do início dos experimentos. Após sangria pelo plexo retro-orbital os tripomastigotas sanguíneos (5.000 parasitos por animal) foram inoculados via intraperitoneal, em grupos de 12 animais para cada linhagem. A parasitemia foi avaliada através da contagem do número dos tripomastigotas em 5 µL de sangue retirado da veia da cauda dos animais infectados. As

contagens foram realizadas a partir do 4º dia de infecção em dias alternados, até a parasitemia se tornar indetectável ou estável em um nível muito baixo. O número de parasitos por mL de sangue foi calculado de acordo com protocolo descrito anteriormente (Brener, 1962). Todos os animais foram manipulados seguindo as normas de boas práticas animais, como definido pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ, Licença nº L-058/08) (ANEXO 01).

3.8 Tratamento dos camundongos infectados

Os experimentos de tratamento também foram realizados no Biotério de Experimentação (BIOTEX) do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ - MINAS). Os animais utilizados foram camundongos Suíços machos, com três ou quatro semanas de idade, cedidos pelo Biotério de Produção também do IRR/FIOCRUZ - MINAS. As formas tripomastigotas sanguíneas foram inoculadas via intraperitoneal (5.000 parasitos por animal), em grupos de quinze animais para cada linhagem. A presença de formas tripomastigotas no sangue foi avaliada através da contagem do número dos tripomastigotas em 5 µL de sangue retirado da veia caudal dos animais infectados. Após quatro dias de infecção foi verificada a presença de parasitos circulantes. Após confirmação da infecção, os camundongos foram submetidos ao tratamento oral com Benzonidazol 100mg/kg durante 20 dias consecutivos. Trinta dias após o final do tratamento, os camundongos foram submetidos à hemocultura. Para isto os camundongos foram submetidos à sangria pelo plexo retro-orbital. Aproximadamente 800 µl de sangue foi dividido em dois tubos contendo 5 ml de meio LIT. Os tubos foram incubados em estufa BOD 26º C. Após 30 dias de incubação, 20µl de cada cultura foi analisada em microscópio óptico para avaliar a presença de parasitos. A porcentagem de cura foi determinada em relação à porcentagem de hemoculturas negativas comparando com as hemoculturas de camundongos controles não-tratados.

3.9. Análise experimental

Nos experimentos de infecção *in vitro*, a infectividade das cepas foi analisada pelo teste One-way ANOVA, enquanto que a cinética de escape de vacúolo e o crescimento intracelular foram avaliados pelo Two-way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Bonferroni, para comparação individual entre as cepas. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.

4. Resultados

4.1. A Superexpressão de Rad51 aumenta a multiplicação intracelular do *T. cruzi*.

Com o intuito de investigar se os níveis de TcRad51 afetariam a replicação intracelular, culturas de fibroblastos infectados com linhagens do clone CL Brener de *T. cruzi* selvagem (WT), superexpressor de Rad51 (TcRad51+) ou heminocaute para Rad51 (TcRad51-/+) foram analisados até 96 horas após a infecção (Fig. 4). A contagem dos parasitas intracelulares por célula infectada nos permitiu determinar o desenvolvimento intracelular em 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. A figura 4 mostra que durante as primeiras 24 horas de infecção todas as linhagens WT, TcRad51-/+ e TcRad51+ comportaram-se de forma semelhante com o mesmo número de parasitas intracelulares por célula infectada. No entanto, observamos diferenças após 48 horas de infecção, período em que os parasitas se diferenciam para a forma amastigota e começam a se replicar por fissão binária. Os parasitas TcRad51-/+ mostraram diminuição do crescimento, com diferença estatisticamente significativa nos tempos 48 e 96h após a infecção quando comparada com WT ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Comparando com os fibroblastos infectados com os parasitas selvagens WT, observa-se um aumento expressivo do número de parasitas intracelulares superexpressores de TcRad51+ ($p < 0,001$) após 72 e 96 horas de infecção. Este resultado demonstra que o nível de expressão de Rad51 interfere no desenvolvimento intracelular, reforçando a importância da TcRad51 para o reparo do DNA e para o crescimento celular do parasito.

Adicionalmente à análise da infecção celular após diferentes horas de incubação avaliamos também um tempo mais curto, 30 minutos após a exposição ao parasito, com o objetivo de avaliar o nível de invasão celular para cada uma das linhagens. Neste experimento, observamos que o número de células infectadas com o parasito Selvagem WT foi maior comparado com as culturas infectadas com os parasitas TcRad51-/+ e TcRad51+ (Fig. 5).

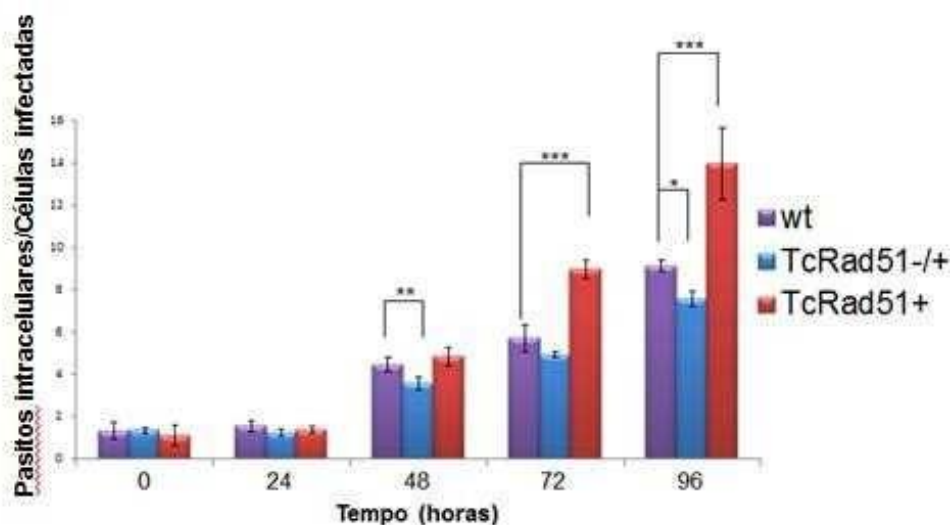


Figura 4: Os níveis de expressão de TcRad51 estão relacionados ao crescimento intracelular do *T. cruzi* em fibroblastos. Fibroblastos murinos foram expostos aos tripomastigotas WT, TcRad51-/- e TcRad51+ (MOI de 50) por 30 min. A monocamada foi lavada para remover os parasitos extracelulares e fixadas (PFA 4%) ou incubaram-se com meio sem parasitos durante diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). As lâminas foram coradas por imunofluorescência e analisadas em microscópio de fluorescência. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA two-way com pós-teste de Bonferroni (* p < 0,05, ** p < 0,01 e ***p < 0,001.). Pelo menos 200 fibroblastos foram analisados.

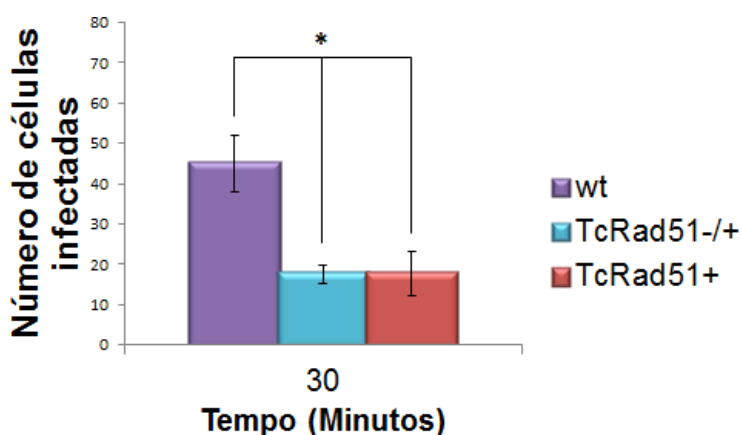


Figura 5: Número de células infectadas pelas linhagem WT, TcRad51 -/- e TcRad51+ após 30 minutos de incubação. Fibroblastos murinos foram expostos aos tripomastigotas WT, TcRad51 +/- e TcRad51+ (MOI de 50) por 30 min. A monocamada foi lavada para remover os parasitos extracelulares e fixadas (PFA 4%). As lâminas foram coradas por imunofluorescência e analisadas em microscópio de fluorescência. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA two-way com pós-teste de Bonferroni (* p < 0,05). Pelo menos 200 fibroblastos foram analisados.

Além de utilizar fibroblastos, nos ensaios de infecção *in vitro*, utilizamos também macrófagos, como modelo de infecção de uma célula fagocítica

profissional (figura 6). A contagem dos parasitos intracelulares por célula infectada nos permitiu determinar o índice de infecção em 48 e 72 horas após a infecção. Semelhante ao resultado observado em fibroblastos, a superexpressão de TcRad51+ aumentou o índice de infecção de macrófagos. Após 48 horas de infecção foi observado um aumento do número de células infectadas com a linhagem TcRad51+ ($p < 0,05$) comparado às linhagens selvagem WT e heminocaute TcRad51-/+ que apresentaram semelhante número de células infectadas. Após 72 horas de infecção, houve um aumento expressivo do índice de macrófagos infectados com os parasitos superexpressores de Rad51+ ($p < 0,001$) comparado com os parasitos selvagens WT. Os parasitos heminocautes mantiveram baixo índice de infecção mesmo após 72 horas de incubação. Esses resultados foram semelhantes aos observados para fibroblastos. Entretanto, a diferença de infecção observado com os parasitos heminocaute é maior quando estes infectam macrófagos quando comparado com a infecção em fibroblasto. Assim como no fibroblasto, avaliamos também um tempo mais curto, duas horas após a exposição ao parasito, com o objetivo de avaliar o nível de invasão celular para cada uma das linhagens. Para isto foi contado o número de células infectadas. Neste experimento, observamos que o número de células infectadas com os parasitos TcRad51+ foi maior quando comparado com as culturas infectadas com os parasitos selvagem WT ou TcRad51-/+ (Fig. 6B).

Uma vez que linhagens modificadas para o gene *rad51* estavam respondendo de forma mais acentuada em macrófagos, verificamos se o nível da proteína Rad51 do parasito era alterado na presença do peróxido de hidrogênio. Como pode ser visto na figura 7, quando o *T. cruzi* é exposto ao peróxido de hidrogênio, ocorre um aumento no nível da proteína Rad51.

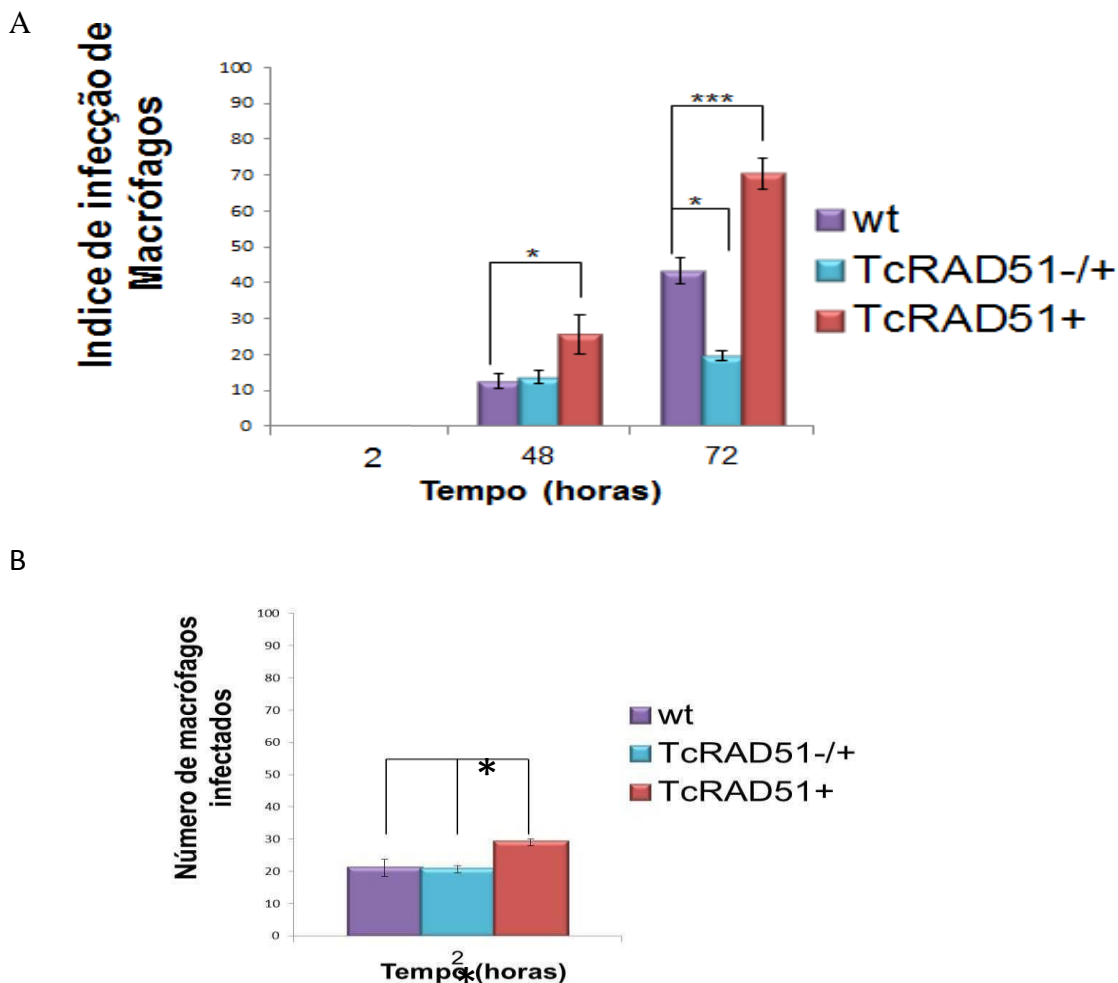


Figura 6: Os níveis de expressão de TcRad51 estão relacionados ao crescimento intracelular do *T. cruzi* em macrófagos. Macrófagos foram expostos aos tripomastigotas WT, TcRAD51 +/- e TcRAD51+ (MOI de 50) por 30 min. A monocamada foi lavada para remover os parasitos extracelulares e fixadas (PFA 4%) ou incubaram-se com meio sem parasitos durante diferentes tempos (48, 72 horas). As lâminas foram coradas por giemsa e analisadas em microscópio óptico. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA two-way com pós-teste de Bonferroni (* p <0,05, ** p < 0,01 e ***p < 0,001.). Pelo menos 200 macrófagos foram analisados. (A) Índice de infecção dos parasitos WT, TcRad51+ e TcRad51-/+ foi determinado pela porcentagem de macrófagos infectados vezes a media de amastigotas por macrófagos. (B) Número de células infectadas por cada linhagem no intervalo de duas horas. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes foram mostrados. Os asteriscos indicam * p <0,05 e ***p < 0,001.

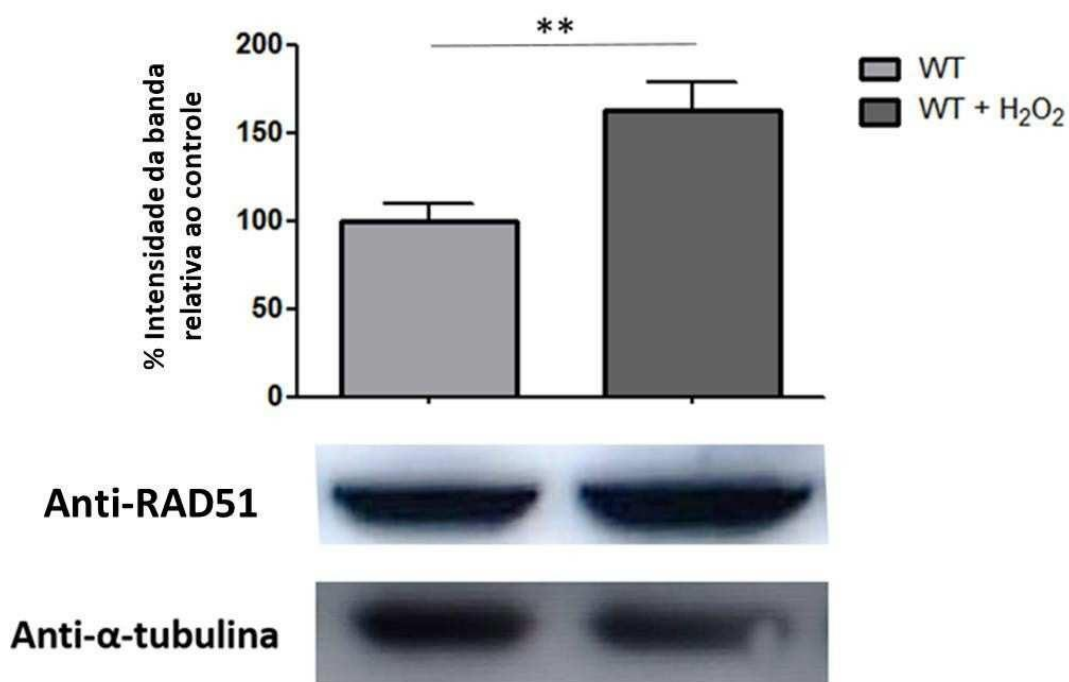


Figura 7: Resposta de *T. cruzi* ao estresse oxidativo. Detecção do nível da proteína TcRad51 em extratos de epimastigotas de células WT antes e depois de tratamento com 200 μ M de H₂O₂ (realizado em triplicata). Lisado celular foi separado em gel SDS-PAGE e as proteínas foram detectadas por *Western blot* com anticorpos anti- TcRad51 (1:2,000) anticorpos secundários anti-IgG (1:10,000 ou 1:12,000) conjugados com peroxidase. O nível de tubulina foi detectado usando anticorpo anti-Tubulina (1:12,000) de camundongo. A análise estatística foi realizada utilizando o Student's *t*-teste. ** $p < 0.01$.

Como as células modificadas para o gene *rad51* foram obtidas na forma epimastigota, pretendíamos verificar se as mesmas continuavam modificadas para o gene *rad51* na forma amastigota. Para tanto, investigamos a infecção de fibroblasto, utilizando as linhagens (WT, *Rad51*^{-/+} e *Rad51*⁺) previamente irradiadas com radiação gama numa dose de 500gy (figura 8). A contagem dos parasitos intracelulares por célula infectada nos permitiu determinar o desenvolvimento intracelular em 24, 72 e 96 horas após a infecção. Nas células infectadas com os parasitos irradiados, independente da linhagem, não foi observado crescimento intracelular no decorrer do tempo.

Mas foi observado um fato interessante, os parasitos irradiados se mantiveram dormentes mesmo após 96 horas de infecção (figura 8B). Por outro lado, a multiplicação intracelular dos parasitos não irradiados foi similar aos resultados anteriormente demonstrados, utilizando-se fibroblastos ou macrófagos. Observamos, uma maior multiplicação intracelular dos parasitos superexpressores e por sua vez os heminocautes apresentaram uma menor multiplicação.

Com o objetivo de investigar se os parasitos irradiados iriam conseguir completar o ciclo celular nos fibroblastos, realizamos um experimento com um tempo de observação mais prolongado. Para isto, fibroblastos plaqueados em garrafas foram infectados com esses parasitos irradiados (*WT*, *Rad51*^{-/+} e *Rad51*⁺). O número de tripomastigotas no sobrenadante foi acompanhado até 23 dias após infecção. Os resultados mostraram que os parasitos não irradiados independente da linhagem analisada infectaram as células e as formas tripomastigotas dessas linhagens foram liberadas no sobrenadante do quarto ao oitavo dia após infecção, corroborando resultados anteriormente descrito nessa tese, a linhagem superexpressora *TcRad51*⁺ apresentou um número maior de tripomastigotas no sobrenadante celular (Figura 9). Com relação aos parasitos irradiados (dose 500 gy) é interessante observar que já no 14^o dia após a infecção verificamos formas tripomastigotas no sobrenadante da cultura infectada com *TcRad51*⁺, com um grande número de parasitos no 19^o dia. Enquanto que, na cultura infectada com o *WT* irradiado os tripomastigotas surgiram apenas no 19^o dia de infecção com um maior número de parasitos no 23^o dia. E na cultura infectada com os parasitos heminocautes

TcRad51-/+ irradiados, os tripomastigotas não surgiram até 23 dias após a infecção.

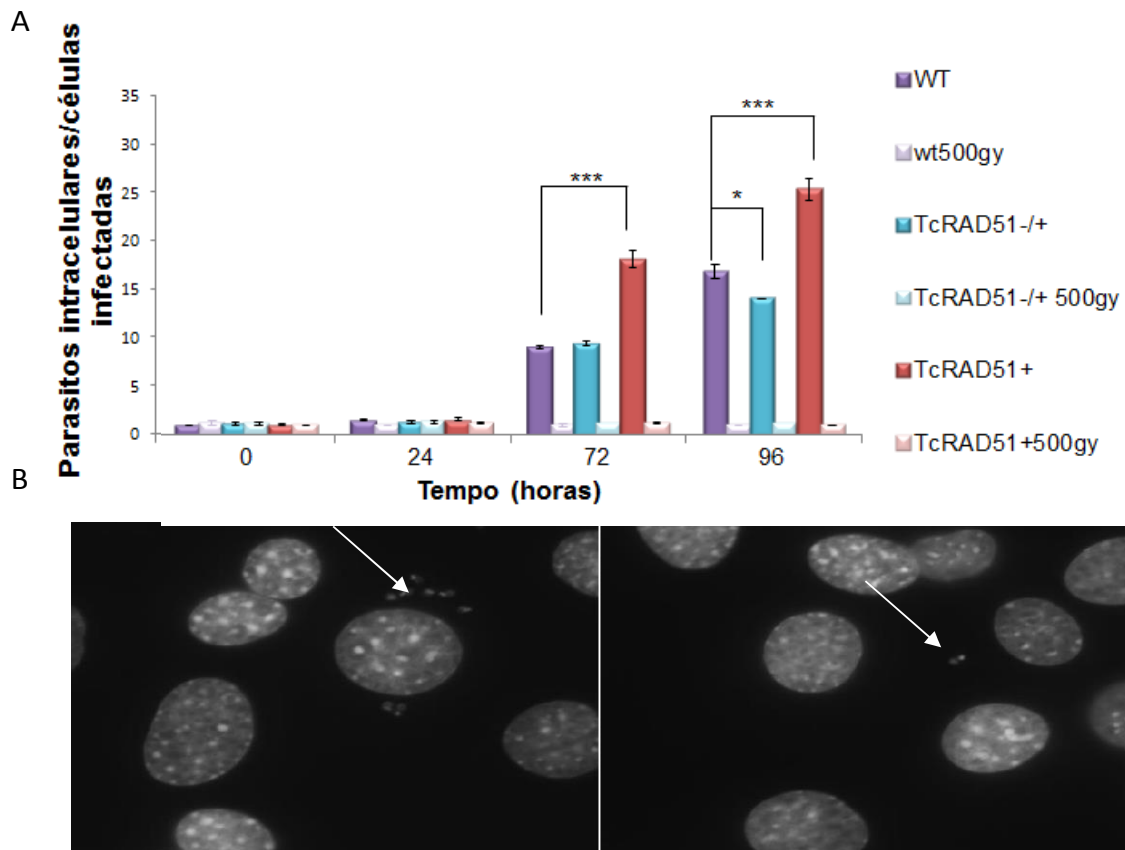


Figura 8: Experimentos de infecção dos mutantes de *T. cruzi* para o gene *rad51* irradiados em fibroblastos. (A) A multiplicação intracelular dos parasitos WT, TcRad51+ e TcRad51 -/+ irradiados ou não com 500 gy de radiação gama foi medida pela contagem dos parasitos internalizadas por 100 células infectadas. Neste gráfico podemos ver a diferença do número de parasitos intracelulares que existem entre o TcRad51+ e o WT nos intervalos de tempo de 72 e 96 horas (***) $p < 0,001$ horas e também a diferença que a entre o WT e o TcRad51-/+ no tempo 96 horas * $p < 0,05$. Também podemos observar que quando as células foram infectadas com linhagens previamente irradiadas com radiação gama, não ocorre multiplicação celular. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes estão mostrados. (B) Imagens obtidas no microscópio de fluorescência mostrando células infectadas com parasitos irradiados ou não no intervalo de 96 horas. A primeira imagem mostra células infectadas com parasitos não irradiados, a seta indica uma célula infectada apresentando um ninho de amastigota. Já na segunda imagem vemos a mesma linhagem, porém esta foi previamente irradiada, como podemos ver na indicação da seta a célula está infectada ainda com um único parasito.

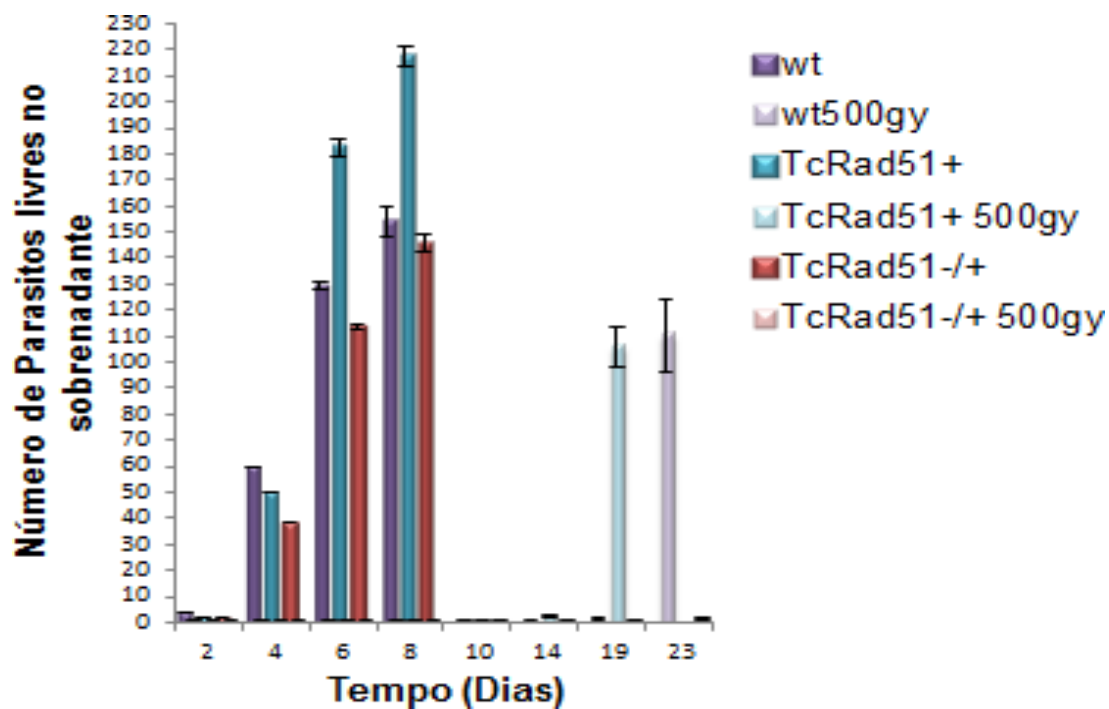


Figura 9: Análise do número de parasitos livres no sobrenadante de cultura de fibroblastos infectadas com os mutantes de *T. cruzi* para o gene *rad51* irradiados. As formas tripomastigotas dos parasitos WT, TcRad51+ e TcRad51-/+ irradiados ou não com 500 gy de radiação gama foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer das formas tripomastigotas livres no sobrenadante celular das garrafas infectadas por essas linhagens. Valores médios e desvio padrão de três experimentos independentes foram mostrados.

4.2 Alterações no nível de TcRad51 alteram o processo de epimastigogênese *in vitro*

Neste estudo, a epimastigogênese, que é a transformação das formas tripomastigotas em epimastigotas, também foi avaliada. As formas tripomastigotas das linhagens WT, TcRad51-/+ e TcRad51+ irradiados ou não com 500gy de radiação gama foram incubadas no meio LIT para a diferenciação em epimastigotas. Através de contagem em câmara de Neubauer por 26 dias foi possível avaliar o processo de transformação das formas tripomastigotas em epimastigotas (Figura 10). No decorrer das contagens houve o gradativo desaparecimento das formas tripomastigotas, o aparecimento das formas intermediárias e a formação de formas epimastigotas. (Figura 10^a e B). É importante ressaltar que as células superexpressoras de *rad51* que conseguem se diferenciar para epimastigota após à exposição com radiação gama.

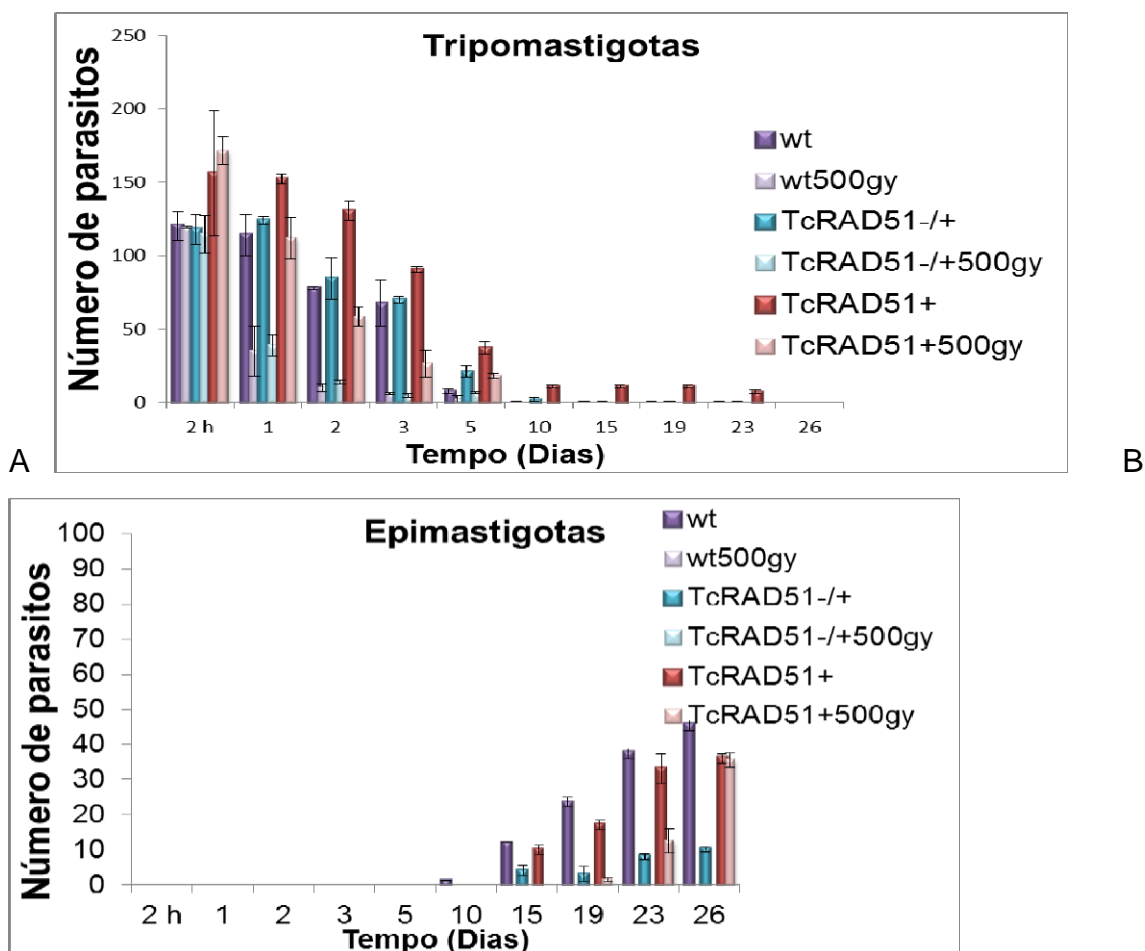


Figura 10: Epimastigogênese nas linhagens de *T. cruzi* WT, TcRad51+ ou TcRad51-/- irradiadas ou não com radiação gama: As formas tripomastigotas foram irradiadas e colocadas em meio LIT e as formas presentes foram avaliadas em câmera de Neubauer por 26 dias; (A) quantificação das formas tripomastigotas; (B) Quantificação das formas epimastigotas. Valores médios e desvio padrão de dois experimentos independentes foram mostrados.

4.3. Análise das curvas de parasitemia de camundongos infectados com linhagens da cepa CL Brener superexpressor de Rad51 e heminocaute para Rad51

Com o intuito de investigar a infecção das linhagens de *T. cruzi* superexpressor de Rad51 e heminocaute para Rad51 *in vivo*, avaliamos a parasitemia de camundongos infectados com essas linhagens. Grupos de 12 animais machos com três semanas de idade foram infectados via intraperitoneal com 5.000 tripomastigotas sanguíneos das linhagens WT;

TcRad51-/+ e TcRad51+. A determinação do número de tripomastigotas sanguíneos foi realizada até 22 dias após a infecção (Figura 11). Os resultados mostraram que os camundongos infectados com parasitos superexpressores e heminocautes apresentaram um pico de parasitemia mais tardio ou a ausência de um pico característico, quando comparado com os animais infectados com os parasitos selvagens (WT). Um pico de parasitemia foi observado no 16^o e 19^o dia de infecção dos animais infectados com WT e Rad51+ respectivamente, enquanto que aqueles infectados com os parasitos heminocaute houve ausência de pico. Entretanto, camundongos infectados com os parasitos superexpressores apresentaram um pico de parasitemia maior do que o WT (Figura 11B).

Além da parasitemia, avaliamos também a mortalidade dos animais. Como mostrado na Figura 12, não houve diferença estatística na taxa de mortalidade entre os grupos de animais analisados. Entretanto, é importante salientar que logo após o pico de parasitemia, após 22 dias de infecção, a porcentagem de sobrevivência dos animais infectados com a linhagem superexpressora de Rad51+ chegou a 4,5% (Tabela 1). Por outro lado, nesse mesmo dia de infecção (22^o dia) a porcentagem de sobrevivência dos animais infectados com as linhagens WT e Rad51-/+ foi 22% e 15,8%, respectivamente.

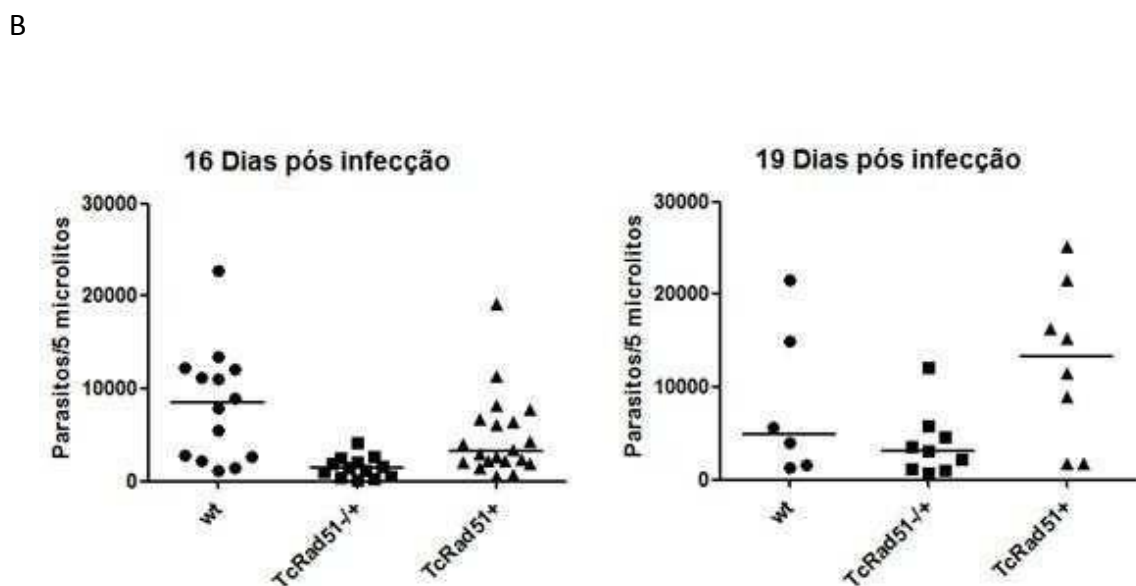
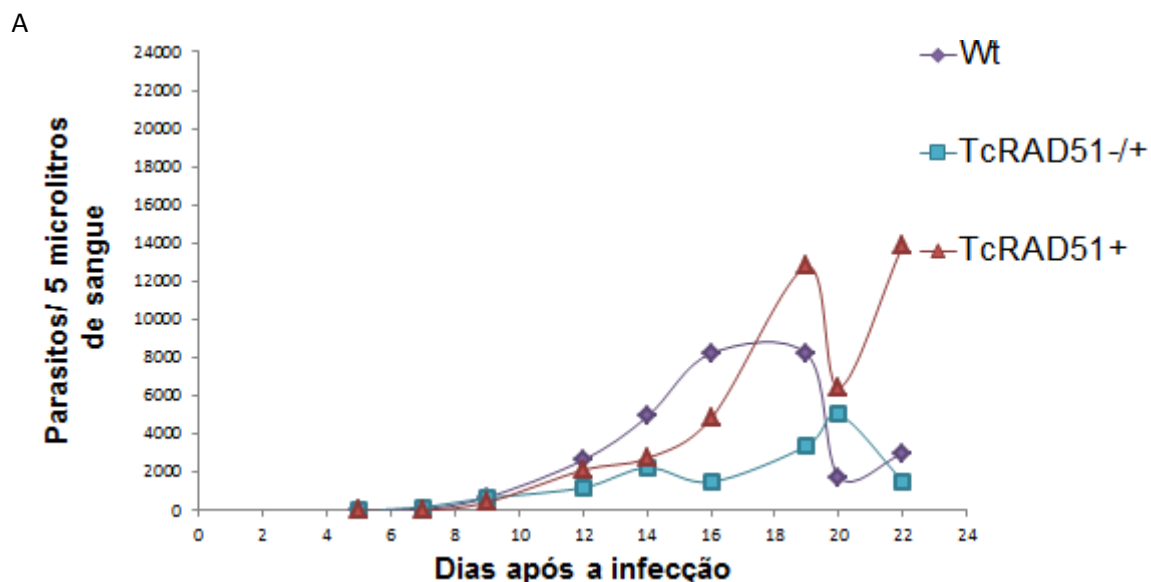


Figura 11: Parasitemia de camundongos suíços infectados com as linhagens de *T. cruzi* WT, TcRad51-/+ ou TcRad51+. Camundongos suíços machos (12 animais por grupo) com três semanas de idade foram infectados intraperitonealmente com 5.000 tripomastigotas sanguíneas. (A) Curva de parasitemia foi avaliada por contagem do número de parasitos no sangue por até 22 dias pós-infecção. O desvio padrão da parasitemia dos camundongos foi abaixo de 25% da média. (B) Gráficos com os picos de parasitemia nos dias 16 e 19 após a infecção evidenciando a maior parasitemia dos camundongos infectados com a linhagem TcRad51+.

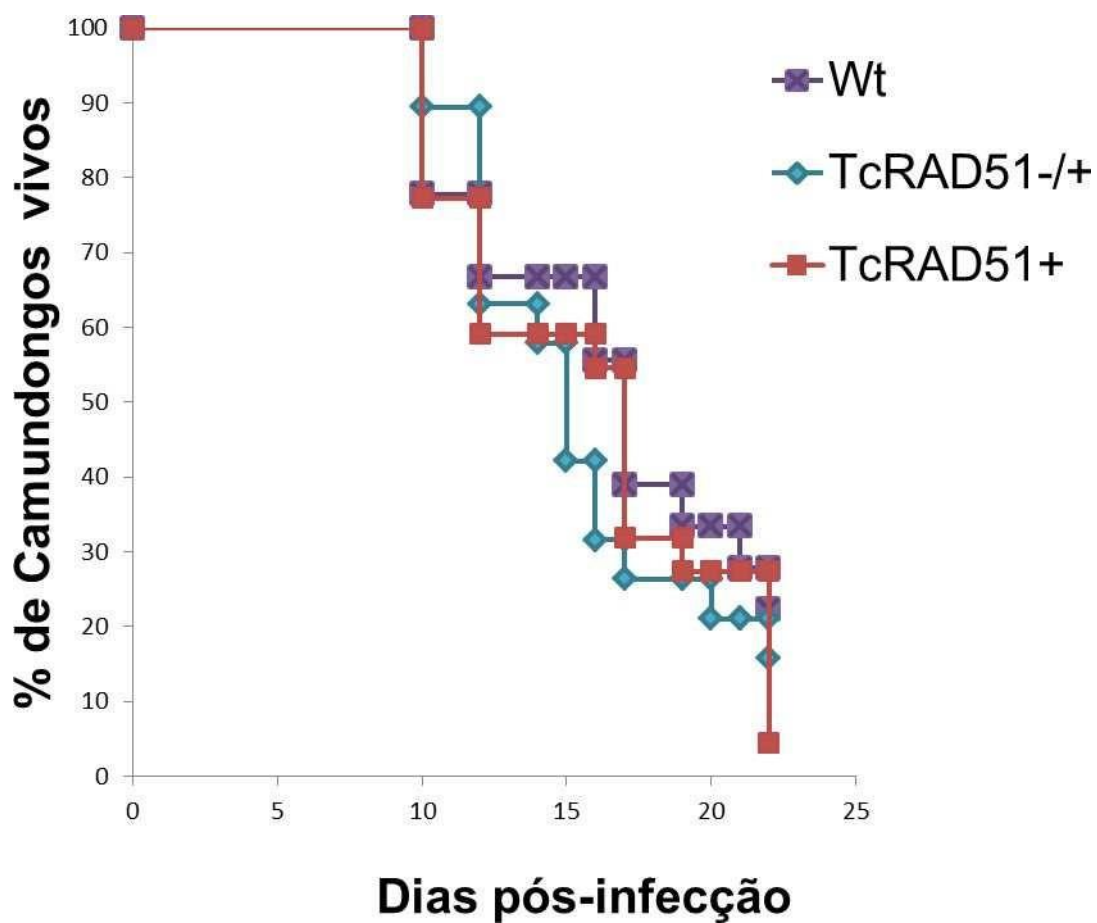


Figura 12: Mortalidade dos animais infectados com as linhagens WT, TcRad51-/+ ou TcRad51+. Camundongos suíços machos (12 animais por grupo) com três semanas de idade foram infectados intraperitonealmente com 5.000 tripomastigotas sanguíneos. A mortalidade desses animais está representada pelas linhas.

Tabela 1

Porcentagem de sobrevivência dos camundongos no decorrer do tempo por linhagens			
Dias	Wt	TcRad51-/+	TcRad51+
0	100	100	100
10	77,8	89,48	77,3
12	66,7	63,18	59,14
14	66,7	57,92	59,14
15	66,7	42,14	59,14
16	55,6	31,62	54,6
17	38,95	26,36	31,9
19	33,4	26,36	27,36
20	33,4	21,1	27,36
21	27,85	21,1	27,36
22	22,3	15,85	4,54

4.4 Superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência ao Benzonidazol *in vivo*

Dados prévios do nosso grupo mostraram que as formas epimastigotas do *T. cruzi* superexpressoras de TcRad51+ apresentam maior resistência ao Benzonidazol quando comparado com a linhagem controle WT (Rajão *et al.*, 2013). Para analisar se Rad51 contribui para a resistência *in vivo* ao BZ,

infectamos intraperitonealmente grupos de 14 camundongos suíços com as linhagens WT, TcRad51+ ou TcRad51-/+ e após 4 dias de infecção confirmada, esses animais foram tratados com BZ por 20 dias consecutivos. A porcentagem de cura foi avaliada por hemocultura realizada 30 dias após o tratamento. A leitura das hemoculturas foi realizada após 30 e 60 dias de incubação e os resultados estão demonstrados na Tabela 2. A porcentagem de cura dos animais infectados com WT e TcRad51+/- e tratados com BZ foi muito semelhante 92,6% e 85,7%, respectivamente. Entretanto a porcentagem de cura dos animais infectados com o superexpressor de Rad51 (TcRad51+) foi de apenas 50%. Esse resultado mostra que esses parasitos apresentam um aumento de mais de 40% na resistência ao BZ ($p < 0,001$).

Tabela 2

Resultado da análise das hemoculturas feitas com o sangue de camundongos infectados com parasitos WT, TcRad51-/+ e TcRad51+ e posteriormente tratados com BZ.

	Número de camundongos	Número de camundongos positivos	% de cura
WT	14	1	92,6
TcRad51-/+	14	2	85,72
TcRad51+	12	6	50

5. Discussão

A proteína Rad51 é uma das principais proteínas envolvidas na recombinação homóloga. Essa proteína é capaz de se polimerizar sobre o DNA de fita simples formando um filamento de nucleoproteínas e buscar regiões homólogas no DNA. A recombinação homóloga tem um papel extremamente importante na mitose, meiose e no reparo de DNA dos organismos.

Além destas funções, alguns estudos têm demonstrado a participação da recombinação homóloga em outros importantes eventos, como virulência de bactérias e infecção de parasitos (Buchermeier *et al.*, 1993; Machado & Ayala, 2001; Mcculloch & Horn, 2009; Stockdale *et al.*, 2008).

A superexpressão de TcRad51 aumenta a resistência contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto a deleção de um alelo de TcRad51 aumenta a sensibilidade a este composto oxidante. O H_2O_2 é um agente oxidante que causa principalmente danos no DNA, incluindo quebras da fita simples, perda de base e geração de 7,8-di-hidro-8-oxoguanina (8oxoG) (Letavayová *et al.*, 2006; Stohl, 2006). O tratamento com H_2O_2 aumentou o nível de proteína TcRad51 em células WT (figura 7), o que reforça a hipótese da participação da HR no reparo de DNA em resposta a lesões oxidativas. Provavelmente, TcRad51 atua na resistência contra o dano oxidativo ao DNA através do reparo destes danos durante a replicação do DNA. Esses achados reforçam as evidências de que os tripanossomatídeos utilizam diferentes vias para lidar com o dano oxidativo, incluindo outras vias de reparo de DNA, como a via de *mismatch repair* (Campos, 2011; Grazielle-Silva *et al.*, 2015).

Diante disso, a proposta dessa tese foi analisar a importância da proteína Rad51 na infecção de fibroblastos e macrófagos pelo *T. cruzi*, na parasitemia de camundongos infectados com parasitos superexpressores e heminocutes para essa proteína e avaliar a porcentagem de cura dos camundongos infectados com esses parasitos após tratamento com benzonidazol.

Visto que TcRad51 é importante para a resposta do *T. cruzi* ao estresse oxidativo, e que durante seu ciclo de vida, o parasito *T. cruzi* é constantemente exposto a esse estresse, nós avaliamos a influência do

TcRad51 e da via da HR na replicação intracelular deste parasito e na sobrevivência dentro do hospedeiro.

Utilizando fibroblastos (células não fagocíticas) e macrófagos (células fagocíticas), verificamos que os parasitos superexpressores TcRad51+ apresentaram maior taxa de infecção quando comparados às células WT, enquanto que os parasitos TcRad51-/+ possuem menor taxa de infecção. Entretanto, as diferenças na taxa de infecção foram mais acentuadas em macrófagos, o que pode estar de acordo com o envolvimento do processo de recombinação em resposta ao estresse oxidativo.

A interação entre o *T. cruzi* e a célula do seu hospedeiro é um fator determinante para uma infecção bem-sucedida. De maneira geral, esta interação é dependente de uma sinalização intracelular na célula hospedeira desencadeada pelo parasito, que culminará no recrutamento de lisossomos para a formação do vacúolo parasitóforo. Assim, a diferença observada no número de células infectadas nos diferentes tipos testados (fagocíticas e não fagocíticas) pode estar relacionada com o mecanismo de invasão celular do *T. cruzi*. Enquanto que em fibroblastos, a entrada do parasito depende principalmente da interação entre as proteínas de superfície dos parasitos com as proteínas da superfície celular do hospedeiro; em macrófagos além destas vias, ocorre também o processo de fagocitose das formas tripomastigotas.

Na infecção de fibroblastos, após 30 minutos, houve um número significativamente maior de células infectadas por parasitos WT ($p < 0,05$), quando comparados às células infectadas por TcRad51+ e TcRad51-/+ . Uma hipótese para o menor número de células infectadas por TcRad51+ e TcRad51-/+ em fibroblasto pode estar relacionado com a interferência da recombinação homóloga nas proteínas de superfície dos parasitos, que são essenciais para as etapas de reconhecimento e invasão celular. Essa hipótese é apoiada pela presença no genoma do *T. cruzi* de famílias multigênicas que codificam para proteínas de superfície que incluem trans-sialidases, mucinas e MASP (El Sayed *et al.*, 2005a). Juntas, essas três famílias gênicas contêm em torno de 2.500 genes aparentemente funcionais, além de mais de 1.000 pseudogenes (revisado por Acosta-Sarrano *et al.*, 2007). O modo como estas proteínas estão presentes no genoma, favorecem a hipótese que a recombinação homóloga

atua nessas famílias do mesmo modo que atua nas VSG, possibilitando a translocação de uma proteína de superfície inativa para o sítio de expressão ativa. Além do fato de que os eventos de recombinação podem criar novas proteínas de superfície celular a partir de pseudogenes destas proteínas, como acontece em *T. brucei*, aumentando ainda mais as possíveis proteínas que estarão sendo expressas na superfície dos parasitas. Para confirmarmos essa hipótese seria necessário estudar se existem diferenças nas proteínas de membrana dos parasitos modificados para o gene *rad51* em relação à linhagem selvagem de *T. cruzi*.

Na infecção em macrófagos foi observado que o índice de infecção de parasitos Rad51+ é significativamente maior, quando comparado com os outros grupos de parasitos (WT e TcRad51-/+). E os parasitos TcRad51-/+ apresentaram índice de infecção significativamente menor. O aumento da sensibilidade de parasitos TcRad51-/+ em macrófagos, pode estar relacionado ao nível de estresse oxidativo produzido por esse tipo de célula quando comparado aos fibroblastos. Os macrófagos respondem à invasão do parasito produzindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) através da ação da enzima NADPH oxidase, que pode espontaneamente formar H_2O_2 (Kierszenbaum *et al.*, 1974; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992b). Gupta e colaboradores demonstraram que, durante a invasão do *T. cruzi* e crescimento intracelular em cardiomiócitos, ocorre uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma da célula hospedeira. Este grupo observou que a produção de ROS pode ser detectada duas horas após a infecção e ela aumenta exponencialmente até 48 horas após a infecção. Este dado se correlaciona com os nossos resultados mostrando crescimento diferente entre as linhagens estudadas, após 48 horas de infecção.

Visto que as ROS criam um ambiente de estresse oxidativo, que podem levar a morte do parasito, parasitos que apresentam uma maior resistência ao estresse oxidativo, possuem vantagem para sobreviver neste ambiente intracelular e se multiplicar. Recentemente, nosso grupo mostrou que parasitos que superexpressam a MutT (enzima que hidrolisa o 8-oxo-dGTP) possuem maior resistência ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 e, também, exibem um aumento significativo na proliferação em fibroblastos e macrófagos

em relação aos tipos selvagens (Aguiar *et al.*, 2013). Além disso, nosso grupo também demonstrou que os *T. cruzi* geneticamente modificados, que expressam a enzima catalase, apresentam maior resistência ao estresse oxidativo causado pela exposição ao H₂O₂, sendo observada também uma alta carga parasitária em macrófagos e em camundongos quando comparadas aos parasitos selvagens (Freire *et al.*, 2017).

Embora a produção de ROS contribua para a eliminação de parasitos, a molécula de H₂O₂ (que gera estresse oxidativo), também pode atuar como intermediário crítico nas vias de sinalização celular (Buetler, 2004; Hamanaka e Chandel, 2010). Um estudo de Czech (1976) demonstrou que, quando adicionado exogenamente, o H₂O₂ poderia mimetizar a atividade de fatores de crescimento. Outros autores demonstraram que a adição de H₂O₂ em baixas concentrações é capaz de aumentar a proliferação celular (Burdon; Gill; Rice-evans, 1989). O papel das espécies reativas de oxigênio como moléculas sinalizadoras também foi descrito em *Leishmania*, sugerindo que estas moléculas atuem como um importante sinal celular que regularia a diferenciação e proliferação por modular a atividade de alvos celulares por oxidação (Mitra; Andrews, 2013). Além disso, foi demonstrado que células de mamíferos produzem H₂O₂ para mediar diferentes respostas fisiológicas, como proliferação celular, diferenciação e migração (Sundaresan *et al.* 1995; Rhee *et al.* 2000).

Em *T. cruzi*, a exposição prévia de epimastigotas a baixas concentrações de H₂O₂ é capaz de fazer com que estes parasitos sejam mais resistentes ao tratamento com doses mais altas de H₂O₂ (Finzi *et al.*, 2004). Paiva *et al.*, (2012) sugeriam que durante a infecção de *T. cruzi* em macrófagos, o estresse oxidativo gerado poderia estimular a infecção. Goes *et al.*, (2016) demonstraram que inibidores de EROs diminuíram a proliferação do *T. cruzi* em macrófagos, entretanto, o tratamento dos macrófagos com H₂O₂ foi capaz de aumentar a replicação dos parasitos nestas células. Além disso, neste trabalho, também foi demonstrado que a exposição de tripomastigotas a 100 uM de H₂O₂ antes de infectar macrófagos gp91phox - / -, promove um aumento no número de amastigotas intracelulares. Estes resultados demonstram que essas tripomastigotas além de serem resistentes a altas concentrações de

H₂O₂, se diferenciam em amastigotas que apresentam uma maior adaptação ao ambiente de estresse oxidativo, por isso, essas formas possuem um crescimento intracelular mais pronunciado quando comparadas formas que não foram expostas ao H₂O₂ (Goes *et al.*, 2016). Além disso, Freire *et al.*, 2017, demonstraram que o tratamento de macrófagos com o antioxidante catalase resultou na redução da proliferação de parasitos superexpressores de MutT e selvagens, sugerindo mais uma vez a importância do H₂O₂ no processo de infecção e de sinalização do estresse oxidativo em *T. cruzi*.

Os dados obtidos até o momento sugerem que as modificações genéticas realizadas nas formas epimastigotas, também estão presentes nas formas amastigotas, ou seja, essas linhagens modificadas geneticamente sintetizam diferentes quantidades de TcRad51 também na forma amastigota. Para confirmar essa hipótese, foram realizados experimentos de exposição à radiação gama. Essa radiação causa quebras duplas na fita de DNA, que são reparadas pela via de recombinação homóloga, na qual o gene *rad51* possui um papel essencial. Em *T. cruzi*, este gene confere uma maior resistência a radiação gama (Regis-da-Silva *et al.*, 2006).

Para as formas epimastigotas de *T. cruzi* a radiação gama não é letal, e a exposição a 500 Gy causa a fragmentação do DNA, promovendo uma parada no seu crescimento. Entretanto, após reparar essas quebras na fita do DNA, o parasito irradiado retoma seu crescimento (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Observa-se que os parasitos irradiados Rad51+, retomam o crescimento antes dos parasitos WT, e os parasitos Rad51-/+ apresentam uma retomada de crescimento mais tardia que as outras duas linhagens (Regis-da-Silva *et al.*, 2006; Passos-Silva, 2010).

Para confirmar se esse fenótipo de resistência e parada do ciclo celular após exposição à radiação gama estaria presente também na forma replicativa amastigota, formas tripomastigotas de cultura foram expostas a 500 Gy dessa radiação, e estes parasitos foram utilizados em ensaios de infecção em fibroblastos. Nossos resultados demonstram que as formas tripomastigotas irradiadas, independente da linhagem de parasitos (WT, TcRad51+ e TcRad51- /+) são capazes de infectar os fibroblastos, entretanto, essas formas não foram

capazes de iniciar o processo de replicação durante o período avaliado (96 h de infecção).

O fato dos parasitos irradiados com radiação gama continuarem dormentes mesmo após 96 horas pode ser devido às quebras de fita duplas no DNA. Essas lesões podem estar impedindo a transcrição do seu DNA e, conseqüentemente a produção de proteínas específicas para sua transformação em amastigota ou replicação (Minning *et al.*, 2003).

A partir desses resultados, analisamos se os parasitos irradiados seriam capazes de completar o ciclo de crescimento e diferenciação intracelular. Para isso, avaliamos um tempo de infecção de 23 dias. Nossos resultados demonstram que os parasitos irradiados TcRad51+ e WT são capazes de completar o ciclo de crescimento e diferenciação intracelular.

Entretanto, eles exibem uma liberação tardia de tripomastigotas de células infectadas (14 e 19 dias após a infecção, respectivamente), quando comparadas às células não irradiadas (4 dias). Além disso, a liberação de tripomastigotas nas culturas infectadas com TcRad51+ é maior do que a verificada para culturas infectadas com WT. Por outro lado, nenhuma liberação de tripomastigota foi observada para culturas infectadas com TcRad51-/+ durante o período de infecção avaliado (23 dias). Estes resultados reforçam a hipótese de que as células geneticamente modificadas sintetizam diferentes quantidades de TcRad51 na forma amastigota, e que o fenótipo de parada do ciclo celular, após radiação gama observado em amastigotas é semelhante ao fenótipo epimastigota após radiação gama.

Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018 observaram que algumas formas amastigotas são incapazes de replicar durante um período prolongado de tempo, sendo denominadas de amastigotas dormentes. Estas formas amastigotas dormentes estariam presentes em muitas células hospedeiras infectadas *in vitro* e *in vivo*. Os autores sugerem que as amastigotas adormecidas têm dois destinos potenciais além de dormência contínua: (1) reiniciar a replicação amastigota convencional - provavelmente quando não há nenhum ou há um número limitado de outros amastigotas na célula, ou (2) se diferenciar em tripomastigotas em conjunto com a replicação amastigotas ativas, passando por esse processo dentro das mesmas células. Curiosamente,

estes autores descrevem que um evento extremamente raro para as formas amastigotas dormentes, em células hospedeiras, é a morte. Neste contexto, as formas amastigotas observadas nas culturas TcRad51-/+ poderiam ter entrado em estado de dormência a fim de resolver os problemas causados pela radiação gama, via eventos de recombinação antes de prosseguir com rodadas de replicação.

Pelo que conhecemos da literatura, o nosso experimento com infecção após a radiação gama é o primeiro exemplo de geração de parasitos que são capazes de infectar uma célula e permanecem dormentes por um grande período de tempo. Este fenótipo abre grandes perspectivas para o estudo da biologia do parasito e do desenvolvimento da doença de Chagas. Por exemplo: células infectadas com um parasito dormente são capazes de ser re-infectadas? Células infectadas por um parasito dormente são capazes de se multiplicar normalmente? Os parasitos dormentes mimetizam o que ocorre entre a fase aguda da doença e fase crônica?

Neste trabalho também avaliamos a epimastigogênese que é a transformação do tripomastigota em epimastigota. Nossos resultados mostraram que o TcRad51-/+ já tem uma maior dificuldade de transformação em epimastigotas mesmo sem sofrer com a radiação gama. Já nos parasitos irradiados apenas observamos as formas epimastigotas no TcRad51+. Nossa hipótese é que esses parasitos que superexpressam a Rad51 conseguiram reparar os danos no seu DNA causados pela radiação gama muito mais rápido e se diferenciaram em epimastigota com maior eficiência. A caracterização proteômica do *T. cruzi* já foi realizada (Atwood III *et al.*, 2005). Os autores identificaram 2.784 proteínas como expressas em diferentes fases do ciclo do parasito, das quais 36% são proteínas hipotéticas, sendo que 348 delas não haviam sido preditas no genoma. Muitas não são estágio-específicas, mas ocorrem em maior quantidade em uma ou outra forma celular, como é o caso da maioria das trans-sialidases, que são altamente expressas em tripomastigotas e diminuem drasticamente sua presença em epimastigotas. Das proteínas encontradas no trabalho de proteômica, 49, 125 e 74 são específicas da fase amastigota, tripomastigota e epimastigota respectivamente. Demonstrando assim que no momento da passagem de uma forma para outra

há necessidade do aumento ou produção de proteínas que são específicas daquela forma apresentada pelo parasito (Atwood III *et al.*, 2005). Dessa forma, se as quebras duplas geradas pela radiação gama inibissem o processo de transcrição, isso poderia explicar o problema de diferenciação verificado após a irradiação gama. Uma questão importante levantada nesse trabalho é se as formas tripomastigotas são capazes de realizar o reparo de DNA.

Nosso próximo passo foi avaliar o papel de Rad51 na infecção *in vivo* e seu efeito sobre o tratamento com Benzonidazol. Nossos resultados mostraram que os parasitos Rad51+ apresentaram um atraso no pico de parasitemia, quando comparado com os parasitos WT. Provavelmente, esse atraso foi decorrente dos parasitos infectarem um número menor de células, como foi demonstrado pelo experimento *in vitro* usando fibroblastos. Esse dado sugere que os macrófagos não são as células mais importantes no processo de infecção e na doença de Chagas, pois os parasitos Rad51+ infectam macrófagos com mais eficiência que os parasitos WT, se os macrófagos fossem os mais relevantes para o nível de parasitemia seria esperado que os camundongos infectados com *T. cruzi* Rad51+ tivessem um pico de parasitemia precoce.

Os camundongos infectados com o superexpressor de Rad51 apresentaram uma parasitemia mais alta do que aqueles infectados com os parasitos selvagens, provavelmente uma consequência do aumento da replicação intracelular. Por outro lado, os camundongos infectados com os parasitos heminocautes apresentaram parasitemia mais baixa e uma ausência de pico, indicando que a perda de um alelo do gene *rad51* prejudica a sobrevivência do parasito *in vivo*. Esses resultados sugerem que os estágios intracelulares de TcRad51-/+ exibem defeitos de crescimento e desenvolvimento, que podem estar envolvidos na incapacidade destes parasitos em estabelecer infecção patente *in vivo*. Seria importante verificar se estes parasitos se encontram em um estado dormente nas células infectadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Belew e colaboradores (2017), quando compararam as taxas de infecção *in vivo* e *in vitro* entre as cepas CL Brener e a CL-14 (avirulenta). A análise do número de amastigotas intracelulares, ao longo do tempo, revelou diferenças significativas de

crescimento. A cepa CL Brener apresentou um crescimento mais rápido que CL-14. Além disso, o crescimento mais lento de amastigotas da cepa avirulenta CL-14 foi relacionado com a liberação tardia de tripomastigotas de células infectadas. A análise comparativa do transcrito entre essas duas cepas, indicou que o fenótipo avirulento de CL-14 pode ser devido, pelo menos em parte, a uma expressão reduzida ou retardada de genes que codificam proteínas de superfície, tais como trans-sialidases, mucinas e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs), que estão associadas à transição de amastigotas para tripomastigotas.

Curiosamente, embora a infecção por TcRad51-/+ , TcRad51 e WT tenha levado a diferentes níveis de parasitos na corrente sanguínea de camundongos, os animais infectados não exibiram uma taxa de mortalidade dependente de parasitemia, mostrando que a parasitemia sozinha não determina a mortalidade do hospedeiro.

No presente trabalho, também demonstramos que o TcRad51 está envolvido na resistência a esse fármaco *in vivo*, uma vez que a superexpressão de TcRad51 causou um aumento na resistência ao Benzonidazol, que foi verificada pela diminuição da taxa de cura em camundongos infectados com essa linhagem. O clone CL Brener que é considerado altamente sensível ao tratamento com BZ (Filard & Brener, 1987; Zingales *et al.*, 1997) tornou-se 40% mais resistente após a superexpressão de TcRad51. De acordo com os dados da literatura, a hemocultura é o melhor indicador para avaliar a cura de camundongos após a quimioterapia e tem sido utilizada para analisar a susceptibilidade ao BZ de cepas de *T. cruzi in vivo* (Filardi & Brener, 1987).

A importância da HR no processo de resistência a fármacos, foi demonstrada também por Genois e colaboradores (2014), em *Leishmania*. Neste estudo foi demonstrado que a RH promove a amplificação de regiões gênicas relacionadas à resistência. Um trabalho recente do nosso grupo mostrou que o TcRad51 poderia estar envolvida com a resistência ao Benzonidazol *in vitro* (Rajão *et al.*, 2014).

Portanto, os dados apresentados neste trabalho mostram a importância do processo de recombinação homóloga para o processo de infecção do *T. cruzi*.

6. Conclusões

A superexpressão do gene *rad51* no clone CL Brener de *T. cruzi* aumenta a multiplicação intracelular dos mutantes, tanto em células fagocíticas profissionais, como nas não profissionais;

Parasitas TcRad51+ conseguem ter uma epimastigogênese eficiente mesmo após ser irradiados com radiação gama.

O pico de parasitemia do mutante TcRad51+ é maior, apesar de tardio, uma vez que esse parasito é mais resistente as espécies reativas de oxigênio, produzidas pelas células, como mecanismo de defesa contra a infecção;

Os camundongos infectados com TcRad51+ se mostraram mais resistentes ao tratamento com BZ apresentando apenas 50% de cura.

7. Referências Bibliográficas

ABUIN, G; COLLI.; DE SOUZA, W.; ALVES, M.J.M. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and Molecular constitution. *Mol. biochem. Parasitol.*, v. 35, p. 229-237, 1989.

ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I.C.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol.* May;114(2):143-150. 2001. Review.

AGUIAR, P. H. N.; FURTADO, C.; R, B. M.; R., G. A.; MENDES, I. C.; PELOSO, E. F.; GADELHA, F. R.; Macedo, Andrea M.; Franco, Glória R.; Pena, Sérgio D. J.; TEIXEIRA, SANTUZA M. R.; VIEIRA, LEDA Q.; GUARNERI, ALESSANDRA A.; Andrade, Luciana O.; Machado, Carlos R. . Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 2013.

ALVES CL, REPOLÊS BM, DA SILVA MS, MENDES IC, MARINA PA, AGUIAR PHN, SANTOS SDS, FRANCO GR, MACEDO AM, PENA SDJ, ANDRADE LO, GUARNERI AA, TAHARA EB, ELIASI MC, MACHADO CR. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep.* 2018 Sep 6;8(1):13335).

ALVES, M. J.M.; COLLI, W. Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: Partial purification by gel chromatography. *FEBS. Lett.*, v.52, p.188-192, 1975.

ALVES, M. J.M.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life.* 2007 Apr-May;59(4-5):274-9.

ANDRADE LO, ANDREWS NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med*, 200:1135-1143, 2004.

ANDRADE LO, ANDREWS NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*, 3: 819-823, 2005.

ANDREWS, N W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, v. 27, n. 2, p. 471-5, 1994.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug design, development and therapy*, v. 4, p. 243-53, 2010.

BELEW AT, JUNQUEIRA C, RODRIGUES-LUIZ GF, VALENTE BM, OLIVEIRA AER, POLIDORO RB, ZUCCHERATO LW, BARTHOLOMEU DC,

SCHENKMAN S, GAZZINELLI RT, BURLEIGH BA, EL-SAYED NM, TEIXEIRA SMR. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. *PLoS Pathog.* 2017 Dec 14;13(12):e1006767. doi: 10.1371/journal.ppat.1006767. eCollection 2017 Dec.

BLUMENTAL Sophie; et. al. First Documented Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection through Blood Transfusion in a Child with Sickle-Cell Disease in Belgium. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 10, p. 1–8, Oct. 2015.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology today (Personal ed.)*, v. 15, n. 1, p. 22-8, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Triagem Neonatal Biológica: Manual Técnico. Brasília, 2016.

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

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 389-96, 1962.

BUETLER, T. M. Role of superoxide as a signaling molecule. *News in Physiological Sciences* 19, 120–123, 2004.

BURDON; GILL; RICE-EVANS. Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun.*, v. 7, n. 3-6, p. 149–59., 1989.

BURLEIGH, B. A. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, v. 2005, n. 293, p. pe36, 2005.

MORROT C. A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTER, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. *J. Exp. Med.*v.192. p.1289–1299, 2000.

CALER, E. V.; VAENA DE AVALOS, S.; HAYNES, P. A.; ANDREWS, N W; BURLEIGH, B. A. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *The EMBO journal*, v. 17, n. 17, p. 4975-86, 1998.

CAMPOS PC, SILVA VG, FURTADO C, MACHADO-Silva A, DAROCHA WD, PELOSO EF, et al. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Mol Biochem Parasitol.* 2011;176: 8–16. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.11.001

CANÇADO, JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. Jan-Feb;44(1):29-37, 2002.

CANÇADO, JR. Terapêutica específica. In: Dias JCP, Coura JR (eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz., 1997. p.323-351.

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.

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem produzida por um *Trypanosoma (Trypanosoma cruzi)*: Nota prévia. *Brasil Médico*. 23:pp. 161, 1909.

Conway C, Proudfoot C, Barry JD, Burton P, McCulloch R. Duas vias de recombinação homóloga em *Trypanosoma brucei*. *Microbiologia Molecular*. 2002; 45 (6): 1687-1700. [[PubMed](#)]

COSTA, E. de G.; et al. Acute Chagas Disease in the Brazilian Amazon: Epidemiological and clinical features. *International journal of cardiology*, v. 235, p. 176–178, Mai. 2017.

COURA JR, DIAS JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 31-40, 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Fiocruz*. v. 110, n.3, p. 277–282, Mai. 2015.

COURA, J. R.; CASTRO, SOLANGE L DE. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

CUCUNUBÁ, Z. M.; et. al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 42, Jan. 2016.

CZECH, M. P. Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 1164–1170, 1976.

DIAS, J. C. P.; et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Epidemiol. Serv. Saúde* v. 25, n. esp., Jun. 2016.

DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E. M.; YOSHIDA, N. Ca⁺² signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules

implicated in mammalian cell invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.73, p.285-289, 1995.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*, v. 126, n. 3, p. 283-91, 2010. Elsevier Inc.

FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A. R. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *The Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 5, p. 909-21, 2011.

FERREIRA I. de L. M.; SILVA, T. P. T. Transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 39 n. 5 p. 507-509, SetOut, 2006.

FERREIRA, F. L.; JANSEN, M. A.; ARAUJO, A. Chagas disease in prehistory. *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, Setembro. 2011. Disponível em: . Acesso em 12 de novembro de 2016.

FIGUEIREDO RCBQ, ROSA DS, SOARES MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol*, 86: 1213-1218, 2000.

FINZI, J. K., CHIAVEGATO, C. W. M., CORAT, K. F., LOPEZ, J. A., CABRERA, O. G., MIELNICZKI-PEREIRA, A. A., COLLI, W., ALVES, M. J. and GADELHA, F. R. (2004). *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Molecular and Biochemical Parasitology* 133, 37–43.

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.

FOTI JJ, DEVADOSS B, WINKLER JA, COLLINS JJ, WALKER GC (2012) Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science* 336(6079):315-9.

FREIRE ACG, ALVES CL, GOES GR, RESENDE BC, MORETTI NS, NUNES VS, et al. Catalase expression impairs oxidative stress-mediated signalling in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2017; 144(11):1–13. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001044> PMID: 28653592

GARCIA, ELOI S; GENTA, F. A.; AZAMBUJA, PATRICIA DE; SCHAUB, GÜNTER A. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in parasitology*, v. 26, n. 10, p. 499-505, 2010.

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.

GENOIS M.M., PAQUET E.R., LAFFITTE M.C., MAITY R., RODRIGUE A., OUELLETTE M., MASSON J.Y. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014;78:40–73

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.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. An acid glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* : assignment of T cell-suppressive

Goes GR, Rocha PS, Diniz AR, Aguiar PH, Machado CR, Vieira LQ. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(4): e0004555. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004555> PMID: 27035573; PubMed Central PMCID: PMC4818108.

GOIJMAN, SG; FRASCH, AC; STOPPANI, AO. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, v. 34, p. 1457-1461, 1985.

GOLGHER, D.B.; COLLI, W. SOUTO-PADRON, T.; ZINGALES, B. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* V.2, n. 40 :249-264. Aug. 1993.

GRAZIELLE-SILVA V, ZEB TF, BOLDEPERSON J, CAMPOS PC, MIRANDA JB, ALVES CL, et al. Distinct phenotypes caused by mutation of MSH2 in trypanosome insect and mammalian life cycle forms are associated with parasite adaptation to oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: 1–27. doi:10.1371/journal.pntd.0003870

GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J.-JUN; et al. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free radical biology & medicine*, v. 47, n. 10, p. 1414-21, 2009. Elsevier Inc.

GUTHER, M. L. S.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L; YOSHIDA, N; FERGUSON, M. A.J. Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7- antigen. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.6820, 1992.

GUTHER, M. L. S.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L; YOSHIDA, N; FERGUSON, M. A.J. Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7- antigen. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.6820, 1992.

HAMANAKA, R. B. and CHANDEL, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 505–513.

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.

HEISE, N.; RAPER, J.; BUXBAUM, L. U; PERANOVICH, T. M. S; CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* v. 271, p.16877-16887, 1996.

HOEIJMAKERS JH. Mecanismos de manutenção do genoma para prevenir o câncer. *Natureza*. 2001; 411 : 366-74.

HOWARD, E. J.; et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 121, n. 1, p. 22–33, Ago. 2014.

IVANOV, EL; HABER, JE. DNA repair: RAD alert. *Curr Biol*. 7(8): 492-5, 1997.

JANZEN CJ, LANDER F, DREESEN O, CRUZ GAM. Regulação do comprimento dos telômeros e silenciamento transcricional em *Trypanosoma brucei* deficiente em KU80 . *Pesquisa de Ácidos Nucleicos* . 2004; 32 (22): 6575-6584. [[Artigo gratuito do PMC](#)] [[PubMed](#)]

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. 1997.

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.

KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 112, n. 5, p. 1839-44, 1974.

KUMAR Y, VALDIVIA RH. Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe*, 5: 593-601, 2009.

LEDERKREMER, R.M.; CASAL, O. L.; TANAKA, C.T.; COLLI, W. A. Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochem. Biophys. Acta*, v.44, p.85-96, 1976.

LEDERKREMER, R.M; CASAL, O. L; TANAKA, C.T.; COLLI,W..Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan of *Trypanosoma cruzi*. FEBS Lett., v.116, p.25-29, 1980.

LETAVAYOVÁ L, MARKOVÁ E, HERMANSKÁ K, VICKOVÁ V, VLASÁKOVÁ D, CHOVANEC M, 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 (Amst). 2006;5: 602–10. doi:10.1016/j.dnarep.2006.01.004

LEY V, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V, ANDREWS NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J Exp Med, 171: 401-413, 1990.

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.

LOPES, M. F.; DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi* induced immunosuppression selective triggering of CD4 T cell death by the cell receptor CD3 pathway and not by the CD9 or Ly 6 activation pathway. Infect. Immun. v.64, p.1559-1564, 1996.

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.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Infection by *Trypanosoma cruzi* Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. J Biol Chem. v. 22, n. 276:19382-19389. Jun. 2001

MASON, R. P.; HOLTZMAN, J. L. The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. Biochemistry 14: 1626-1632, 1975.

MAYA, J. D.; ORELLANA, M.; FERREIRA, J. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biological research, v. 43, n. 3, p. 323-31, 2010.

MAYA, JD, CASSELS, BK; ITURRIAGA-VÁRQUEZ, P, FERREIRA, J; FAÚNDEZ, M; GALANTI, N; FERREIRA, A; MARELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp. Biochem. Physiol. A, Mol. Integr. Physiol., v. 146, p.601-620, 2006.

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.

MCCULLOC, R; BARRY JD. Papel for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma cruzi* antigenic variation. *Genes Dev.* 13(21):2875-88, 1999. [mcentrez&rendertype=abstract](#), 1998.

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.

MCNEIL, P. L.; KIRCHHAUSEN, T. An emergency response team for membrane repair. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 6, n. 6, p. 499-505, 2005.

MEIRELLES, M.N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* v.2, n. 52:175-184. Jun.1992.

MIGUEL, C. B.; et al. Chagas Disease and Transfusion Transmission: A Review. *SM Trop Med J.* v. 2, n. 1, Mar. 2017.

MINNING TA, BUA J, GARCIA GA, MCGRAW RA, TARLETON RL 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 131: 55-64.

MITTRA, B. and ANDREWS, N. W. (2013). IRONY OF FATE: role of ironmediated ROS in *Leishmania* differentiation. *Trends in Parasitology* 29, 489–496.

MOODY, T.N.; OCHIENG. J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *Febs Lett.* v. 470, p. 305-308, 2000.

MORTARA, R. A; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N. et al. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 1, p. 77-94, 2005.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology letters*, v. 33, n. 1, p. 35-40, 1992b.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *European journal of immunology*, v. 22, n. 2, p. 301-7, 1992a.

MURTA, A.C. M; PERRSECHINI, P. M; SOUTO-PADRON, T; DE SOUZA, W; GUIMARÃES, J.A; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 43, p.27-38, 1990.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.405–414, 2002.

PAIVA, C. N., FEIJÓ, D. F., DUTRA, F. F., CARNEIRO, V. C., FREITAS, G. B., ALVES, L. S., MESQUITA, J., FORTES, G. B., FIGUEIREDO, R. T., FANTAPPIÉ, M. R., LANNES-VIEIRA, J. and BOZZA, M. T. (2012). Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Clinical Investigation* 122, 2531–2542.

PASSOS-SILVA D. G. Estudo do papel do gene Rad51 de tripanossomatídeos na recombinação e no reparo. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) ICB – UFMG; 2010.

PEREIRA, M. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*., in: *Modern Parasite Biology – cellular*, I.a.M.A. (Ed.), Wyler Dj, W. H. Freeman and Compan, New York, 1990, pp. 428.

PETRY, K.; VOISIN, P. J; BALTZ, T; LABOUESSE, J. Common epitopes to *Trypanosoma cruzi* , *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, astrocytes and neurons. *J. Neuroimmunol.*, v.16, p.237, 1987.

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, 2009.

PINTO AMT. Infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* modifica o padrão de secreção de cardiomiócitos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

PREVIATO, J. O.; ANDRADE, A.F. B.; PESSOLANI, M. C. V.; MENDONÇAPREVIATO, L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* , v.16, p.58, 1985.

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.

RAJÃO MA, FURTADO C, ALVES CL, PASSOS-SILVA DG, de Moura MB, Schamber-Reis BL, Kunrath-Lima M, Zuma AA, Vieira-da-Rocha JP, Borio Ferreira Garcia J, Mendes IC, Junho Pena SD, Macedo AM, Franco GR, de Souza-Pinto NC, de Medeiros MH, Cruz AK, Machado Motta MC, Ribeiro Teixeira SM, Machado CR. 2013. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. Environmental and Molecular Mutagenesis

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. de C.; ARAYA, J. E.; DA SILVEIRA, J.F.; YOSHIDA, N.. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. Infect. Immun., v.61, p.3636-3641, 1993.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, JOSÉ ANTONIO. Chagas disease. The Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010b.

RASSI, A. JR; RASSI, A; REZENDE. J. M. de. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infectious Disease Clinics of North America. PLoS Neglected Tropical Diseases. v. 26, n. 2, p. 275-291, Jun. 2012.

REGIS-DA-SILVA CG, FREITAS JM, PASSOS-SILVA DG, FURTADO C, AUGUSTO-PINTO L, PEREIRA MT, DAROCHA WD, FRANCO GR, MACEDO AM, HOFFMANN JS, CAZAUX C, PENA SD, TEIXEIRA SM, MACHADO CR. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. Mol Biochem Parasitol, 149: 191-200, 2006.

REIS, G.A. Down regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by relationship. Review. The J. of Cell Biology, v.158, n.3, p. 389–394, 2002. Review

REQUENA-MÉNDEZ, A.; et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 2, p. 1–15, Fev. 2015.

RHEE, S. G., BAE, Y. S., LEE, S. R. and KWON, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. Science's STKE 53, pe1.2000.

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. 1998.

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.

RODRIGUEZ A, MARTINEZ I, CHUNG A, BERLOT CH, ANDREWS NW. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem*, 274:16754-16759, 1999.

ROPERT, C.; FERREIRA, L.R.; CAMPOS, M.A.; PROCOPIO, D.O.; TRAVASSOS, L.R.; FERGUSON, M.A.; REIS, L.F.; TEIXEIRA, M.M.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes Infect.*, v.4, p.1015-1025, 2002.

RUIZ, R. C.; FAVORETO Jr., S.; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* isolates is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.*, v. 330, p.505–511, 1998.

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.

SÁNCHEZ-VALDÉZ FJ, PADILLA A, WANG W, ORR D, TARLETON RL. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*. 2018;7:e34039. Published 2018 Mar 26. doi:10.7554/eLife.34039

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A. P. SCHAUER, R.; REUTER, G.; MÜHLPFORDT, H.; ANDRADE, A.F.B.; PEREIRA, M. E.A. The occurrence of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. v. 364.p.1053-1057, 1983.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M.A.L.; HEISE, N.; ALMEIDA, M.L.C.; MORTARA, R.; YOSHIDA, N.. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Bioherm. Parasitol.*, v.59, p.293-304, 1993.

SCHOFIEL, CJ; JANNIN, J; SALVATELLA, R. The future of chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583- 588, 2006.

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.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological reviews*, v. 240, n. 1, p. 72-91, 2011.

De SOUZA W., De CARVALHO T.M.U. & Barrias E.S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010: 1–19.

SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J.J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell. Sci.*, v.96, p.485-490, 1990.

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 EA, SEIFERT HS. *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair 954 enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *J 955 Bacteriol.* 2006;188: 7645–7651. doi:10.1128/JB.00801-06
SUNDARESAN, M., YU, Z. X., FERRANS, V. J., IRANI, K. and FINKEL, T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296–299. 1995.

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.

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.

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.

TARDIEUX I, WEBSTER P, RAVESLOOT J, BORON W, LUNN AJ, HEUSER JE, ANDREWS NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, 71: 1117-1130, 1992.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *The Journal of experimental medicine*, v. 179, n. 3, p. 1017-22, 1994.

THACKER, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* 219 (2): 125–135, 2005.

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.1159., 1986.

TRAINA, M. I.; et al. Prevalence of Chagas Disease in a U.S. Population of Latin American Immigrants with Conduction Abnormalities on Electrocardiogram. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 1, p. 1-8, Jan. 2017.

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. 1998

WILKINSON, SR. *et al.* A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 105, p. 5022-5027, 2008.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A; et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of cell science*, v. 116, n. Pt 17, p. 3611-22, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.* v. 6, n. 90, p. 33–44, Fev. 2015.

YOSHIDA N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais Acad Bras Cien*, 78: 87-111, 2006.

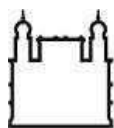
YOSHIDA, N.; FAVORETO, Jr. S.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz. J. Med. Biol.*, v.33, p.269–278, 2000.

YOSHIDA, N; MORTARA, R. A; ARAGUTH, M. F; GONZALEZ, J.C; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50- kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* v.57. p.1663-1667,1989.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Tripanosoma cruzi* interaction with host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.117, p.129, 1985.

8. Anexos

8.1 CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice- Presidência de Pesquisa e
Coleções Biológicas



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-26/16

Certificamos que o protocolo (P-14/15-3), intitulado "Testes da atividade anti- Trypanosoma cruzi de produtos naturais e compostos sintéticos.", sob a responsabilidade de ALVARO JOSÉ ROMANHA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 04/07/2020 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 10 Machos de Swiss webster, Idade: 4 Semana(s), Peso: 22,0000 Grama(s).
- 10 Fêmeas de Swiss webster, Idade: 4 Semana(s), Peso: 22,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 576 Fêmeas de Swiss webster, Idade: 4 Semana(s), Peso: 22,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 304 Fêmeas de Swiss webster, Idade: 4 Semana(s), Peso: 22,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 4 de julho de 2016

Octavio Augusto França Presgrave

Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ

Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

8.2: The in vivo and in vitro roles of Trypanosoma cruzi Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions

RESEARCH ARTICLE

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

Danielle Gomes Passos Silva¹✉, Selma da Silva Santos^{1,2}✉, Sheila C. Nardelli³, Isabela Cecília Mendes, Anna Cláudia Guimarães Freire, Bruno Marçal Repolês, Bruno Carvalho Resende, Héllida Marina Costa-Silva, Verônica Santana da Silva, Karla Andrade de Oliveira¹, Camila Franco Batista Oliveira¹, Liza Figueiredo Felicori Vilela¹, Ronaldo Alves Pinto Nagem, Glória Regina Franco, Andrea Mara Macedo, Sergio Danilo Junho Pena¹, Erich Birelli Tahara¹, Policarpo Ademar Sales Junior², Douglas Souza Moreira², Santuza Maria Ribeiro Teixeira¹, Richard McCulloch⁴, Stela Virgilio⁵, Luiz Ricardo Orsini Tosi⁵, Sergio Schenkman⁶, Luciana Oliveira Andrade⁷, Silvane Maria Fonseca Murta², Carlos Renato Machado^{1,*}



1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, 2 Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil, 3 Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba, PR, Brazil, 4 Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom, 5 Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 6 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo 669, São Paulo, São Paulo, Brazil, 7 Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, MG, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* crmachad@icb.ufmg.br

OPEN ACCESS

Citation: Gomes Passos Silva D, da Silva Santos S, Nardelli SC, Mendes IC, Freire ACG, Repolês BM, et al. (2018) The *in vivo* and *in vitro* roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions. PLoS Negl Trop Dis 12(11): e0006875. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875>

Editor: Carlos A. Buscaglia, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, ARGENTINA

Received: January 31, 2017

Accepted: September 26, 2018

Published: November 13, 2018

Copyright: © 2018 Gomes Passos Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (grant numbers: APQ-02308-13, APQ-00827-15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number: 444334/2014-9), Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (grant numbers: 17/07092-

Abstract

In *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, Rad51 (TcRad51) is a central enzyme for homologous recombination. Here we describe the different roles of TcRad51 in DNA repair. Epimastigotes of *T. cruzi* overexpressing TcRAD51 presented abundant TcRad51-labeled foci before gamma irradiation treatment, and a faster growth recovery when compared to single-knockout epimastigotes for RAD51. Overexpression of RAD51 also promoted increased resistance against hydrogen peroxide treatment, while the single-knockout epimastigotes for RAD51 exhibited increased sensitivity to this oxidant agent, which indicates a role for this gene in the repair of DNA oxidative lesions. In contrast, TcRad51 was not involved in the repair of crosslink lesions promoted by UV light and cis-platin treatment. Also, RAD51 single-knockout epimastigotes showed a similar growth rate to that exhibited by wild-type ones after treatment with hydroxyurea, but an increased sensitivity to methyl methane sulfonate. Besides its role in epimastigotes, TcRad51 is also important during mammalian infection, as shown by increased detection of *T. cruzi* cells overexpressing RAD51, and decreased detection of single-knockout cells for RAD51, in both fibroblasts and macrophages infected with amastigotes. Besides that, RAD51-overexpressing parasites infecting mice also presented increased infectivity and higher resistance against benzimidazole. We thus show that TcRad51 is involved in the repair of DNA double

9) , Pró-Reitoria de Pesquisa/UFMG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

strands breaks and oxidative lesions in two different *T. cruzi* developmental stages, possibly playing an important role in the infectivity of this parasite.

Author summary

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, a tropical neglected illness that affects 6 million people worldwide, mostly in Latin America. Our research group focuses on the elucidation of DNA repair and metabolism of *T. cruzi*, and on the possible implications of those mechanisms in both parasite genetic diversity and Chagas disease development. In this work, we investigated the involvement of homologous recombination in the oxidation-induced damage response, and in DNA repair, in *T. cruzi* cells after gamma radiation exposure. We also examined whether TcRad51 –a key protein for homologous recombination–could be an important factor for *T. cruzi*'s infectivity. We generated genetically-modified *T. cruzi* cells for RAD51 and studied the *in vitro* and *in vivo* infectivity of these mutant cells. Our results indicate that TcRad51 is a key protein involved in the repair of oxidative and DNA double-strand breaks lesions in two crucial developmental forms of *T. cruzi*.

Introduction

Homologous recombination (HR) is a crucial, error-free pathway required to repair a diverse array of potentially lethal lesions, which include interstrand crosslinks, ssDNA gaps left behind by the replication fork, and DNA double-strand breaks (DSBs)—generated either as a result of replication fork collapse, or from processing of spontaneous damage or from exposure to DNA-damaging agents such as gamma radiation. Among these lesions, DSBs present the highest cytotoxicity, since a single unrepaired DSB can lead to aneuploidy, genetic aberrations, and cell death [1,2].

Rad51 is a key component of the HR machinery. This protein binds exposed 3' single strand DNA ends at a DSB, and catalyzes their invasion into intact DNA duplex, generating homologous pairing and promoting recombination [3]. Studies in yeast, mammalian cells, and other organisms revealed a role for Rad51 in the repair of DSBs generated upon treatment with ionizing radiation and other genotoxic agents [4–7]. The process of HR has been described in trypanosomatids, a group of protozoa involved in several human and animal parasitic diseases like Chagas disease, sleeping sickness, and leishmaniasis. African trypanosomes use DNA recombination to evade the mammalian immune system through antigenic variation; in fact, mutation of Rad51 from *Trypanosoma brucei* impairs HR, reduces the frequency of antigenic variation, and increases the parasitic sensitivity to DSBs-inducing agents [6]. In most eukaryotes, the major alternative repair mechanism of DSBs is the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway. Genome sequences of *T. brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* revealed that trypanosomatids appear to lack some of the core proteins for NHEJ [8]. Experiments in *T. brucei* designed to detect NHEJ supported its absence and revealed an end-joining process mediated by sequence microhomology, suggesting that HR plays the predominant role in the repair of DSBs [9,10]. Glover and colleagues (2008) reinforced this idea when demonstrated that the repair of a single DSB in the genome of *T. brucei* is preferentially performed by HR through foci formation promoted by Rad51 [11], and cell cycle arrest. Rad51 from *L. major* also seems to present a role in DSBs repair since treatment with phleomycin causes an

elevation in the transcription of this gene [12]. Interestingly, little work has been done to study HR in *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease, a debilitating illness that affects 10 million people worldwide, mostly in Latin America. Alarming, 25 million people are currently exposed to the risk of this disease [13].

T. cruzi is a parasite that has two hosts during its life cycle: one invertebrate, which is an insect of the *Reduviidae* family, and the other vertebrate, which comprises several mammalian species, including humans. Having such a complex life cycle, *T. cruzi* has to present adaptability to very distinct environments. During its insect phase, this parasite grows in the intestine lumen, where it is exposed to several environmental changes such as temperature, osmolarity, pH, nutrients and oxidative stress, both from hemoglobin degradation and nitrogen intermediary production from the insect immune system [14–16]. Infection of mammalian cells begins with the recruitment and fusion of lysosomes, organelles that present a highly acidic, oxidative environment. Thereafter, a parasitophorous vacuole is formed in the host cell from which the parasite is able to escape towards the cytoplasm. Then, *T. cruzi* cells divide as amastigotes, which are a target of reactive oxygen species produced by the host cell and its respiratory chain [17,18].

Our first step to better understand the molecular mechanisms of HR in *T. cruzi* was to characterize TcRad51, whose mRNA is shown to be transcribed in all three life cycle forms of *T. cruzi* [7]. Remarkably, when we examined the resistance of *T. cruzi* epimastigotes against gamma irradiation (1–5 kGys), we found that this genotoxic treatment resulted in cellular growth arrest, and also in DNA fragmentation, resulting in shattered chromosomes. Shattered chromosomes were repaired in 48 h, and epimastigotes overcame the growth arrest a few days later. A direct role for TcRad51 in DSBs repair was suggested by the induction of TcRad51 gene expression after the exposure of epimastigotes to gamma rays. Indeed, overexpression of TcRad51 in *T. cruzi* resulted in a faster kinetics of chromosome repair, with intact chromosomes becoming visible within 24 h, leading to a faster cell growth recovery [7]. RAD51-overexpressing cells (TcRAD51^{ox}) also presented higher resistance against zeocin, another DSBs-inducing agent. To further understand the role of TcRad51 in the repair of DSBs in *T. cruzi*, we generated single TcRAD51 allele knockout cells (TcRAD51^{+/-}) through targeted gene deletion of TcRAD51. We compared the TcRAD51^{+/-} knockout cells to both TcRAD51^{ox} and wild-type (WT) cells after exposing them to different genotoxic agents: gamma radiation, UV light, cisplatin, hydroxyurea (HU) and MMS. Since these agents cause distinct lesions, our findings show that the levels of TcRad51 dictate the sensitivity of parasites to DSBs and oxidative agents, but not to cross-linking agents. Additionally, we showed that TcRad51 probably acts as a contributing factor for infectivity in *T. cruzi*, since TcRAD51^{ox} cells present an increased number of parasites in fibroblasts and macrophage cells when compared to WT parasites. TcRAD51^{ox} cells also presented an increased parasitemia and greater resistance against benznidazole in animal models.

Materials and methods

Ethics statement

All mouse experiments were performed in compliance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (CEUA-LW-54-12, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ).

Cellular growth

Epimastigotes from *T. cruzi* clone CL Brener were cultivated at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) medium (pH 7.3) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), streptomycin sulfate

(0.2 mg.mL⁻¹) and penicillin (200 units.mL⁻¹). WT cells, as well as TcRAD51^{ox} cells, were characterized by Regis-da-Silva *et al.* (2006) [7].

Plasmid construction and transfection

Vectors used to delete TcRAD51 were generated as follows: primers were designed to amplify DNA fragments of 461 and 541 bp of length from the 5' UTR and 3' UTR of TcRAD51, respectively. These two resultant DNA fragments were designed to flank the hygromycin phosphotransferase gene to obtain, through cloning using a pGEM-T vector, the deletion cassette harboring ApaI and SacI sites. Resultant constructs were released by ApaI and SacI digestion and then transfected into electroporated *T. cruzi* epimastigotes according to a previously described protocol [19]. Transfected parasites were selected after 4 weeks of culture in the presence of hygromycin B (200 µg.mL⁻¹). Isolated hygromycin B-resistant clones were obtained as previously described in [20].

Real-time PCR

Genomic DNA from WT and modified *T. cruzi* strains were extracted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific), using the indicated protocol from the manufacturer. DNA integrity was verified by running the samples onto an electrophoresis gel, and 5 ng of total DNA were used for real-time PCR. The number of TcRAD51 copies in each strain was determined by using genomic DNA as a template for reactions containing 5 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 0.25 M of each primer (TcFwRAD51: GTGCCCTCGTGGTAAACC and TcRevRAD51: GCGGATGAACCCATT). Reactions were performed using Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Reaction conditions are already described in a previous study [7].

Southern blotting analysis

Genomic DNA (5 µg) from *Trypanosoma cruzi* WT and RAD51^{+/-} cells were treated with *Nde*I and *Bgl*I restriction endonucleases at 37°C for 24 h and digestion products were resolved by gel electrophoresis (0.7% agarose; 1x TAE; at 40V; for 16 h). DNA was transferred to Hybond-N+ membranes (GE Life Sciences) and probed with PCR-amplified 1062 bp hygromycin (HYG) and ~550 bp 3'-RAD51 (RAD) fragments from *T. cruzi*. Hybridization was carried out at 60°C using Amersham™ AlkPhos Direct Labelling and Detection System with Amersham™ CDP-Star™ Detection Reagent (GE Life Sciences).

Anti-TcRad51 antiserum and Western blotting

Recombinant TcRad51, purified as a C-terminally His-tagged variant in *Escherichia coli*, was used to immunize mice in order to obtain anti-TcRad51 antiserum. C57Bl/6 mice were immunized with 10 µg of TcRad51-His protein in aluminum hydroxide adjuvant by subcutaneous injection. Four subsequent boosts (15, 30, 45 and 60 d after the first immunization) were performed. Mouse serum was collected 10 d after the last immunization, and non-immune serum was obtained from the same mouse before first immunization.

For Western blot assays, exponentially grown *T. cruzi* epimastigotes were used to prepare protein extracts. Cells were washed and resuspended in SDS gel-loading buffer [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol] at a final concentration of 2.10⁵ cells, and boiled for 10 min, generating the total extract. Proteins were separated on a 10% SDS polyacrylamide gel, blotted (2 h, 200 mA) onto nitrocellulose membranes, and incubated with primary antibody [1:2,000 dilution for anti-TcRad51; 1:3000

for rabbit anti- γ H2A, produced and kindly provided by Dr. Richard McCulloch's lab [21]; or 1:12,000 dilution for anti-alpha-tubulin monoclonal (Abcam), and then with secondary antibody conjugated with peroxidase [anti-mouse or rabbit IgG (GE), 1:10,000 dilution]. Antibody binding was visualized through the use of ECL-Plus Western Blot Detection System (GE). Images were recorded using STORM Phosphoimager (GE).

TcRad51 immunolocalization

TcRad51 immunolocalization experiments were performed by attaching $2 \cdot 10^5$ cells prewashed with PBS onto glass slides, and fixation was carried out with 4% *p*-formaldehyde in PBS for 20 min. Slides were then washed three times with PBS and treated with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, before being incubated for 30 min with 1% bovine serum albumin diluted in PBS. Next, slides were incubated overnight with polyclonal anti-TcRad51 antiserum diluted 1:2,000 in PBS containing 1% bovine serum albumin and, after that, were washed three times. Primary antibodies were detected with anti-mouse secondary antiserum conjugated with Alexa Fluor 555 (anti-mouse IgG—Invitrogen) diluted 1:5,000 in the presence of 0.01 mM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Vectashield (Vector Laboratories) was used for mounting, and slides were visualized using a 100X oil immersion objective (1.3 numerical aperture) from a Nikon E600 microscope coupled to a Nikon DXM1200F camera. Images were processed for color using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Incorporated). At least 200 cells were analyzed per coverslip.

Fluorescence quantification was performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For each time point after gamma radiation, approximately thirty parasites were analyzed. Nuclei were individually delimited, and the mean labeling intensity under sub-saturating conditions was determined. Student's *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test were performed using GraphPad Prism software (version 3.0).

Genotoxic treatment

WT epimastigotes were compared to TcRAD51^{ox} cells and to TcRAD51^{+/-} parasites by plating 1×10^7 cells.mL⁻¹ in the presence or absence of genotoxic agents. For hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment, parasite cultures were treated with 0, 150, 200 or 250 μ M H₂O₂. UVC irradiation (254 nm) was performed with a germicidal lamp at a fluence rate of 0, 5,000, 10,000 or 15,000 J.m⁻². For cisplatin treatment, cells were incubated with 0, 25, 50 or 75 μ M cisplatin. In all aforementioned conditions, surviving cells were counted 2 d after treatment. For HU treatment, parasites were incubated with 0, 10, 20 or 30 mM HU for 24 h in LIT medium. For MMS treatment, parasites were incubated with 1.5 mM MMS for 60 min in PBS buffer. For HU and MMS treatments, drugs were removed by centrifugation, and cells were incubated in fresh LIT medium. The number of parasites was determined every 24 h, for 5 d. For gamma irradiation treatment, cell cultures were exposed to a dose of 1578 Gy.h⁻¹ for 20 min using a cobalt (⁶⁰C) irradiator (Gamma Radiation Laboratory—CDTN, UFMG). The number of cells was determined for a period of 16 d. Erythrosine vital stain assay using a cytometry chamber was the method used to differentiate living and dead cells. Experiments were performed in triplicate.

Pulsed-field gel electrophoresis

Chromosomes from different *T. cruzi* samples (CL Brener WT, TcRAD51^{ox}, and TcRAD51^{+/-}) were treated with gamma irradiation (500 Gy) as described above and incubated in LIT medium for 0, 24, 48, 72 or 96 h. After, agarose blocks containing intact *T. cruzi* chromosomes were prepared and separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the Gene

Navigator™ system (GE Life Sciences, Little Chalfont, UK) as previously described [22]. Optimized separations of chromosomes were obtained using pulsed-field gel electrophoresis intervals of 90 s for 30 h, 200 s for 30 h, 400 s for 30 h and 600 s for 18 h at 90V and 9°C. Following PFGE, gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg.mL⁻¹).

In vitro cell infection experiments

All *in vitro* cell infection experiments were performed using a mouse fibroblast cell lineage (WTC13) derived from mouse embryonic fibroblasts [23]. Prior to infection, fibroblasts were plated at the concentration of 2.5.10⁴ cells/mL in medium containing 10% FBS in 24-well tissue culture plates containing 12 mm round coverslips, and grown for 24 h, at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Infection of fibroblasts with purified tissue culture trypomastigotes (TCTs) was performed for 30 min at 37°C at a multiplicity of infection (MOI) of 50. Immediately after infection, fibroblasts were washed four times with PBS in order to remove extracellular parasites, and re-incubated with fresh medium for 30 min (time point = 0 h), 24, 48, 72 and 96 h, before fixation with 4% (wt/vol) paraformaldehyde/PBS overnight, at 4°C.

After fixation, coverslips with attached fibroblasts were washed three times in PBS, incubated for 20 min with PBS containing 2% BSA, and processed for an inside/outside immunofluorescence invasion assay as described previously [24]. Next, the DNA of host cells and parasites was stained for 1 min with DAPI (Sigma), mounted, and examined on a Zeiss Axio-plan microscope (Carl Zeiss AG). Approximately 200 to 300 fibroblasts were counted, and 15 to 20 fields were evaluated per coverslip.

Mice infection and parasitemia curves

Blood of mice infected with *T. cruzi* was collected from orbital venous sinus (0.5–0.6 mL), diluted in 3.8% sodium citrate, and inoculated intraperitoneally in non-infected mice. Groups of 19 to 22 male Swiss albino mice of 18–20 g were inoculated with 5,000 bloodstream forms of each *T. cruzi* sample. Parasitemia was followed from the 5th to the 22nd day of infection by collecting fresh blood from the tail of mice, and estimating the number of parasites as described by Brener (1962) [25]. Parasitemia curves and the mortality rate of mice infected with different *T. cruzi* samples were evaluated.

Analysis of susceptibility of long-term benznidazole-treated mice

Groups of 12 or 14 male Swiss mice ranging from 18 to 20 g were intraperitoneally inoculated with 5,000 *T. cruzi* blood forms. Five days after inoculation, every animal was examined in order to ensure that the infection was properly established. Then, *T. cruzi*-infected mice were submitted to a long-term treatment with oral doses of benznidazole (100 mg/kg of body mass) for 20 consecutive days. Hemoculture was used as the criterion of cure for benznidazole-treated mice. Thirty days after the end of long-term benznidazole treatment, mice were the subject of orbital venous sinus bleeding, and 0.6 mL of blood was collected and divided into 2 tubes containing 5 mL of LIT medium. Tubes were incubated at 28°C for 30 to 60 days and examined microscopically in order to verify the possible presence of parasites. If both hemoculture tubes were negative for *T. cruzi*, the animal was considered cured.

Immunofluorescence of parasite infection

After fixation, coverslips with attached cells were washed three times in PBS, incubated for 20 min with PBS containing 2% bovine serum albumin (PBS/BSA), and processed for an inside/

outside immunofluorescence invasion assay as described previously [24]. Briefly, to distinguish extracellular parasites from intracellular ones, cells were incubated for 50 min in the presence of a polyclonal anti-TcRad51 (produced in rabbit) solubilized in PBS/BSA (1:500 dilution), followed by a 40-min incubation with Alexa-Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) diluted 1:250 in PBS/BSA. For vacuole escape kinetics experiments, after extracellular-parasite staining, cells were permeabilized with PBS/BSA containing 0.5% saponin (PBS/BSA/saponin) for 20 min. Parasites associated with parasitophorous vacuole were labeled using a 50 min-incubation with rat anti-LAMP1 antibody diluted 1:50 in PBS/BSA/saponin, followed by 40 min-incubation with a 1:250 dilution of Alexa-Fluor 488 goat anti-rat IgG (Invitrogen) in PBS/BSA/saponin. DNA from cells and parasites was stained with DAPI diluted 1:1,000. Slides were mounted and then examined on a Zeiss Axioplan-2 microscope. Experiments were performed in biological triplicates, and at least 200 cells were analyzed per coverslip.

Macrophage infection experiments

For experimental infection of THP-1 macrophages, cells were diluted to a density of 5.10^5 cells.mL⁻¹ in RPMI medium supplemented with 10% FBS. Immediately after the addition of propidium monoazide (PMA) at a concentration of 50 mg.mL⁻¹, macrophages were seeded onto 24-well plates (containing round glass coverslips of 13 mm diameter), and incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ for 72 h to allow differentiation. Tissue-culture trypanomas-tigotes were then purified, counted and diluted in RPMI medium, and infection was performed for 2 h at an MOI of 5. Immediately after macrophage infection, cells were washed four times with PBS to remove extracellular parasites, and then either fixed or re-incubated with medium for 48 and 72 h before fixation with methanol. Coverslips with attached macrophages were stained with Giemsa, and a minimum of 300 macrophages per coverslip were analyzed. Results were expressed as an infection index (% infected macrophages vs. number of amastigotes per the total number of macrophage). Experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Data are presented as mean±standard deviation (SD). The level of significance was set to $p < 0.05$. All experiments were performed at least three times.

Results

Generation of TcRad51 single knockout cells

In order to evaluate the roles of TcRad51, we disrupted one allele of the TcRAD51 gene (Gene ID: 3546453 and 3537322) in the *T. cruzi* genome. As described in *Experimental procedures*, a TcRAD51 deletion cassette was obtained and used to transfect epimastigote cells. *T. cruzi* hygromycin B-resistant clones were then recovered (sequence analysis is shown in [S1 Fig](#)). PCR analysis showed that one allele of TcRAD51 was disrupted in the selected clones ([Fig 1A](#)). The single allele deletion confirmation was conducted by real-time PCR analysis with genomic DNA of WT and TcRAD51^{+/-} cells, allowing the verification that the CT value for TcRAD51 amplification was 20.89 in TcRAD51^{+/-}, while 18.49 for WT cells—TcATR was used as control, and its CT value was 19.89 in TcRAD51^{+/-}, and 20.01 in WT cells. The Southern blot analysis using a probe which hybridizes with hygromycin B resistance gene ([Fig 2B](#), lower panel) showed two bands of increased intensity (~1300 and ~2200 bp) when DNA from TcRAD51^{+/-} was assayed ([Fig 1C](#), Probe HYG), resulted from the digestion of the hygromycin B-mutated allele with both BglIII and NdeI—in fact, the hygromycin B resistance gene displays a NdeI

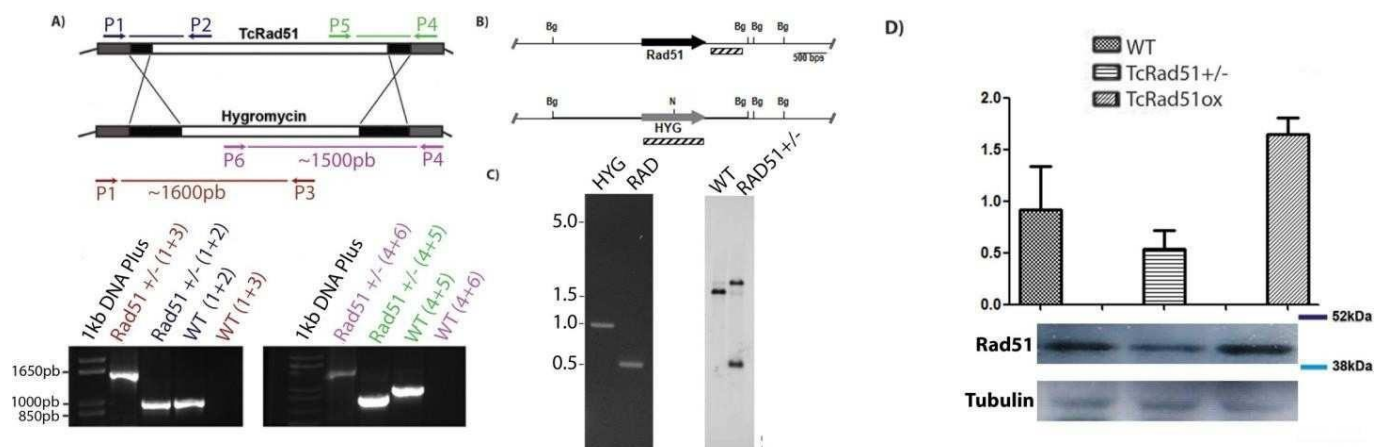


Fig 1. Generation of TcRAD51^{+/+} knockouts mutants and TcRad51 protein levels. (A) Ethidium bromide stained gel showing PCR products generated with primers represented in the schematic representation. PCR was performed using genomic DNA of WT and TcRAD51^{+/+} epimastigotes. Upper panel: schematic representation of RAD51 and hygromycin allele detection. Note that the amplicon is only synthesized if the pair of primers simultaneously hybridizes inside and outside the deletion cassette. The figure is not on scale. (B) Schematic representation of the Southern blot analysis showing BglII sites and the probes used (C) Left panel: Purified HYGB and RAD51 fragments generated by PCR-amplification. Right panel: Southern blot analysis of BglII- and BglII-digested genomic DNA from WT and TcRAD51^{+/+} cells and probed with HYGB and RAD51 fragments. Ethidium bromide-stained agarose gel showing the digestion products that were further analyzed by Southern blotting. (D) Detection of TcRad51 levels in epimastigotes protein extracts from WT, TcRAD51^{ox}, and TcRAD51^{+/+} cells. Cellular lysates were separated by SDS-PAGE, and proteins were detected by Western blot with anti-TcRad51 (1:2,000) antiserum and peroxidase-conjugated anti-IgG secondary (1:10,000 or 1:12,000). A control showing tubulin levels was performed using mouse anti-tubulin (1:12,000) antiserum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g001>

restriction site (Fig 1B). The faint band observed around 3500 bp in the TcRAD51^{+/+} lane is probably due to incomplete digestion of genomic DNA. As expected, WT cells do not harbor the hygromycin B resistance gene and thus not produce any signal. Besides that, when a probe which hybridizes with TcRAD51 was used (Fig 1B, upper panel), the same band of ~1300 was observed when DNA from TcRAD51^{+/+} was assayed, indicating the presence of a DNA fragment double-digested with BglII and NdeI, leading to the conclusion that the hygromycin B resistance gene was successfully inserted into the TcRAD51 locus. Also, in line with predictions, a larger fragment produced from the digestion with BglII was produced in both WT and TcRAD51^{+/+} cells, indicating the existence of a WT locus of TcRAD51. Also, interestingly, the two larger bands (~3400 and 3600 bp) produced by BglII digestion when using the TcRAD51-- hybridizing probe in WT cells did not display the same signal intensity which was expected (Fig 1C, Probe RAD)—the genome sequence of *T. cruzi* in TriTrypDB indicates the presence of two alleles of TcRAD51 that differs by a DNA insertion in a non-transcribed region (S1 Fig). Since the ~3400 bp fragment is the one most present in the WT cells, we infer that the majority of the WT CL Brener population used for the experiments is homozygous for the non-Esmeraldo TcRAD51 allele. Also, the Southern blot results (Fig 1C), together with the genomic DNA sequencing (S1 Fig), indicates that the hygromycin B resistance gene was inserted into the TcRAD51 locus of a *T. cruzi* population that is homozygous for the Esmeraldo TcRAD51 allele. We speculate that, after the selection pressure, a specific subpopulation of CL Brener, homozygous for the TcRAD51 allele, was transformed with the DNA cassette and, therefore, generated the pattern observed on Fig 1.

Levels of TcRad51 affect *T. cruzi* growth and DNA repair after gamma irradiation

In a previous report, we showed that overexpression of TcRAD51 leads to an increased efficiency of DNA repair of shattered chromosomes caused by gamma irradiation [7]. To further

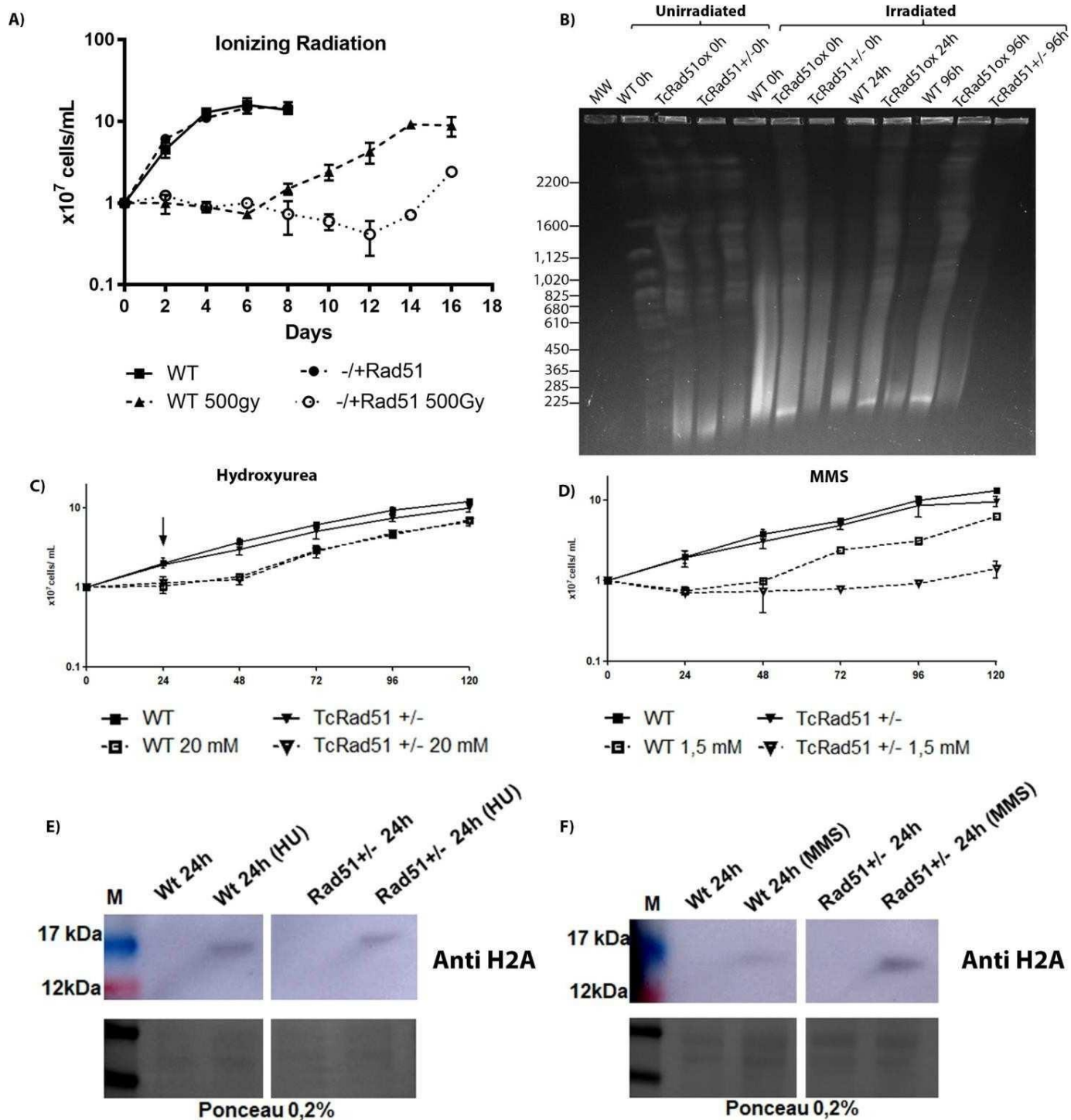


Fig 2. Growth of *T. cruzi* following DNA damage treatment. A) The sensitivity of WT and TcRAD51^{-/-} cells to gamma radiation was determined. Parasites were exposed to 0 Gy or 500 Gy of gamma irradiation, the number of parasites was determined every two days for 28 d. Values represent the mean of triplicates and error bars indicate standard deviations. B) Chromosomal profile from different *T. cruzi* (WT, TcRAD51^{lox} and TcRAD51^{+/-}) samples after treatment with gamma radiation (500 Gy). Chromosomal bands from different *T. cruzi* samples were separated by PFGE and stained using ethidium bromide. Whole chromosomes from *Saccharomyces cerevisiae* were used as molecular weight markers. (C) *T. cruzi* growth curve after treatment with 20 mM HU. Arrow indicates the point when the drug was removed. (D) *T. cruzi* growth curve after treatment with 1.5 mM MMS. The number of cells was determined every 24 h by vital staining. Curves shown are an example of three independent experiments that were performed in triplicate. Error bars represent standard deviations. (E) Detection of H2A levels in epimastigotes treated with 20 mM

HU. Cell lysates were separated by SDS-PAGE, and proteins were detected by Western blot using anti-H2A (1:3,000) antiserum and peroxidase-conjugated anti-IgG secondary (1:10,000 or 1:12,000). Loading control is depicted in the bottom panel (Ponceau 0.2%). (F) Detection of H2A levels in epimastigotes treated with 1.5 mM MMS. Cell lysates were separated by SDS-PAGE, and proteins were detected by Western blot with anti-H2A (1:3,000) antiserum and peroxidase-conjugated anti-IgG secondary (1:10,000 or 1:12,000). Loading control is depicted in the bottom panel (Ponceau 0.2%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g002>

examine this observation, we asked if decreasing the levels of TcRad51 would promote an effect on the recombination levels in *T. cruzi*. We compared TcRAD51^{+/-} and WT cells after parasite exposure to 500 Gy of gamma radiation (Fig 2). Despite presenting similar growth rates in the absence of induced DNA damage, cells presented a distinct pattern of growth after exposure to gamma radiation. Immediately after irradiation, both WT and TcRAD51^{+/-} cells ceased dividing, although the number of cells did not decrease significantly. In WT, cells growth arrest persisted for 6 d, by the end of which cellular division resumed. In contrast, TcRAD51^{+/-} cells presented a considerable delay in growth recovery, with an increase in cell concentration only observed around 12 d after gamma irradiation. Indeed, the number of cells appeared to decrease to some extent until day 12 after induced DNA damage. A PFGE was performed, and chromosomes from WT, TcRAD51^{ox}, and TcRAD51^{+/-}, after treatment with gamma radiation (500 Gy), were clearly separated and ranged in size from 225 to 2,200 Kb (Fig 2B). Chromosomal profile differed among *T. cruzi* samples analyzed after gamma irradiation. Interestingly, TcRAD51^{ox} parasites rapidly repair their chromosomes, presenting visible intact DNA content 24 h after exposure to gamma radiation; in contrast, TcRAD51^{+/-} parasites do not repair their chromosomes even 96 h after being exposed to gamma radiation. WT parasites repair their chromosomes since chromosome bands are observed after 96 h of gamma irradiation. These results confirm that the overexpression of TcRAD51 increases the resistance against gamma irradiation and that one TcRAD51 allele is sufficient to increase sensitivity to this genotoxic agent. Taken together, these results indicate a major role of TcRad51 in the repair of DSBs in *T. cruzi* DNA.

To investigate the role of TcRad51 in the repair of HU-induced replicative stress in WT cells and TcRAD51^{+/-} mutants, *T. cruzi* cells were treated with 20mM of this agent for 24 h (Fig 2C). No difference was observed when we used other doses of HU (S2 Fig). Both cell types exhibited the same growth profile, which suggests that TcRad51 is not important for the repair of this kind of DNA damage. Methylating agents, like MMS, produce several types of DNA adducts, which induce replication-dependent DSBs [26]. To study the role of TcRad51 in the repair of MMS-induced DNA damage, WT and TcRAD51^{+/-} cells were treated with 1.5 mM MMS for 60 min. TcRAD51^{+/-} cells showed a delayed recovery after the treatment in relation to WT cells (Fig 2D). In order to verify if the generation of DSB's resulted from the exposure to MMS and HU, a Western blot was performed with the same amount of drugs used in the curves: both MMS and HU treatments were able to increase H2A, a marker for double-strand breaks, in WT cells and TcRAD51^{+/-} mutants (Fig 2E and 2F). Interestingly, the MMS treatment led to an increased amount of H2A in TcRAD51^{+/-} cells when compared to the WT strain; this result suggests that TcRad51 is necessary to cope with replicative stress generated by MMS. Since the level of H2A does not differ between WT cells and TcRAD51^{+/-} mutants after HU treatment, we suggest that TcRad51 is not involved in the repair of lesions promoted by HU.

Kinetics of TcRad51 immunolocalization after exposure to gamma radiation

To investigate the kinetics of TcRad51 function in the repair of DSBs in *T. cruzi*, we performed the immunolocalization of TcRad51. WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} cells were analyzed at

different times (0, 1, 4, 24, 48 and 72 h) after exposure to 500 Gy of gamma radiation. [Fig 3A](#) shows a low detectable TcRad51 signal prior to irradiation in WT and TcRAD51^{+/-} cells compared to visible foci seen in TcRAD51^{ox} parasites. Following the damage, a progressive accumulation of TcRad51 was observed in the nucleus, with discreet foci formation after 24 h of damage, as previously shown for *T. brucei* after phleomycin treatment [27]. A less intense staining accumulation throughout the nucleus was verified for TcRAD51^{+/-} cells in comparison to the other cell lines. TcRAD51^{ox} cells presented higher fluorescence intensity before radiation compared to WT cells, though maximal signal levels were similar for both of them 24 h after irradiation ([Fig 3A](#), lower panel). We were able to detect TcRad51 in the nuclei of parasites at all time points analyzed ([Fig 3B](#)). TcRad51 fluorescence signal reached the highest level after 24 h and began to decrease thereafter in WT and TcRAD51^{ox} cells ([Fig 3B](#) middle and right panels). [S3 Fig](#) shows fluorescence images representing nuclei localization over time in all cells after gamma irradiation. In contrast, TcRAD51^{+/-} cells presented a delay in TcRad51 accumulation in the nucleus after radiation, with maximum signal only apparent after 48 h ([Fig 3B](#)); in addition, in these parasites, the levels of fluorescence were not comparable to those observed in WT cells. Taken together, these data suggest that decreasing or increasing the levels of TcRad51 result in changes in the kinetics of localization of this protein in the nucleus after radiation damage.

TcRad51 does not mediate resistance against DNA cross-linking agents

Besides its role in the repair of DSBs, Rad51 –through homologous recombination–allows the restart of blocked replication forks [28]. In order to complete replication, cells must overcome replication fork barriers, such as secondary structures on DNA, or cross-links caused by treatment with genotoxic agents such as cisplatin and UV light. To verify whether TcRad51 plays a role in these processes, WT, TcRAD51^{ox} and TcRAD51^{+/-} cells were exposed to increasing doses of cisplatin or UV light ([Fig 4A e 4B](#)). All cells presented similar survival curves after both treatments. These results demonstrate that TcRad51 does not play a pivotal role in the resistance against agents involved in the generation of intra- or inter-strand DNA cross-link damage in *T. cruzi*.

TcRad51 is involved in the repair of oxidative lesions

Different oxidative lesions can be promoted to DNA by H₂O₂, including DSBs [29]. DSBs can be formed by oxidation through aborted repair of primary DNA lesions, or through stalled replication forks. Since TcRad51 does not appear to be involved in the repair of crosslink DNA damage, we decided to evaluate the contribution of TcRad51 to the cellular response against oxidative stress. To address this possibility, cells were exposed to different doses of H₂O₂ and had their survival rates determined after 48 h following treatment measured. As shown in [Fig 5A](#), TcRAD51^{ox} parasites had an increased resistance against H₂O₂ when compared to WT parasites, while TcRAD51^{+/-} cells were more sensitive to oxidation than WT parasites: in the presence of 250 μM H₂O₂, 24% of WT cells survived compared with 64% of TcRAD51^{ox} and 7% of TcRAD51^{+/-} cells. To test the involvement of TcRad51 in the response to H₂O₂ treatment, a Western blot was performed using anti-TcRad51 antibody. [Fig 5B](#) shows that the levels of TcRad51 increase after H₂O₂ treatment in WT cells. These results suggest that TcRad51 can mediate resistance against H₂O₂, most likely by guiding HR in repairing the damage caused by this oxidant agent.

TcRad51 levels influence the intracellular growth of amastigotes

In order to investigate whether TcRad51 levels affect intracellular replication after the invasion of mammalian host cells, fibroblast cultures were infected with WT, TcRAD51^{-/+} or

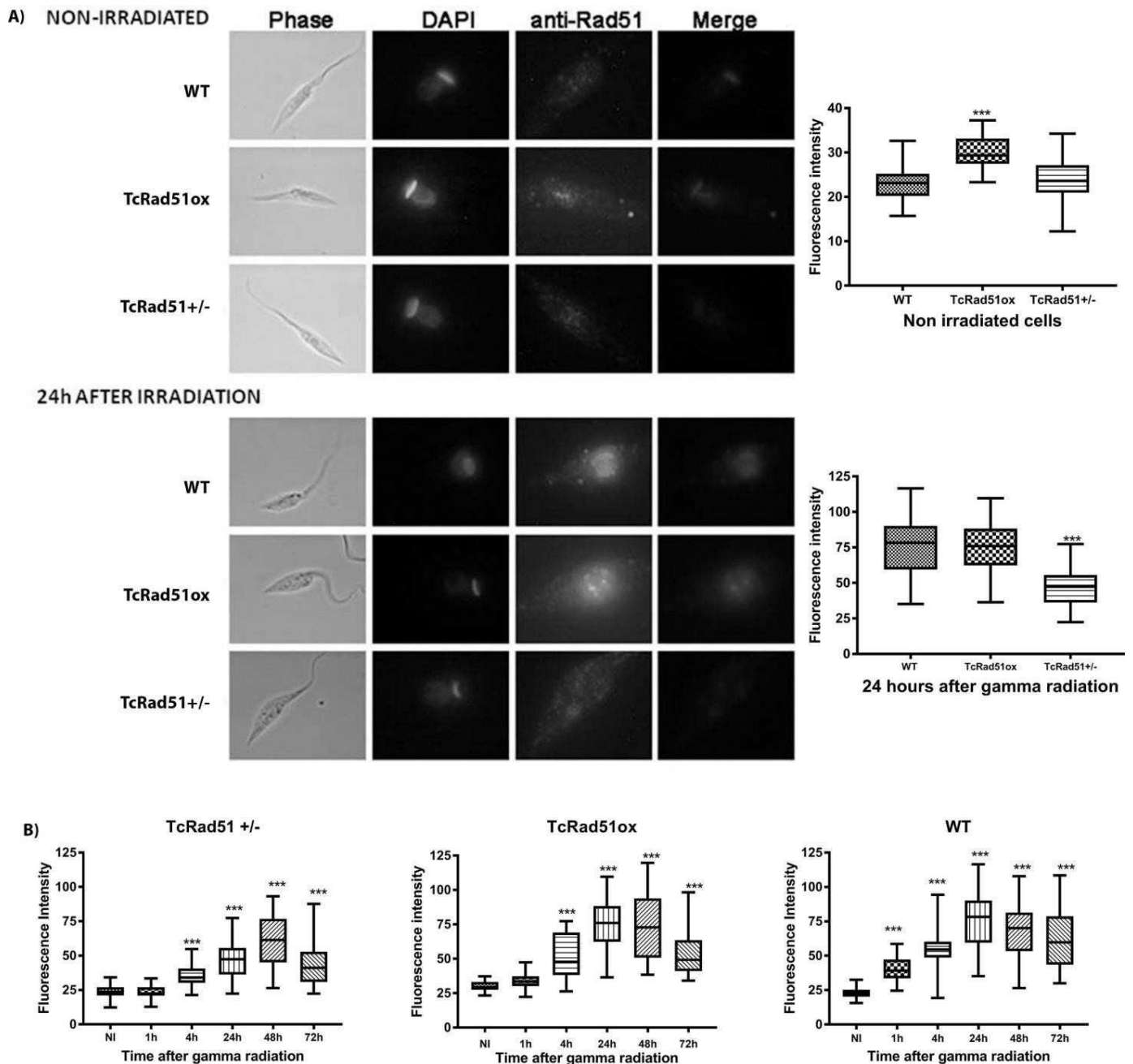


Fig 3. TcRad51 immunolocalization in *T. cruzi*. A) WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} cells are shown before irradiation (non-irradiated) and 24 h after exposure to 500 Gy of gamma irradiation. DNA is shown stained with DAPI and TcRad51 was detected using anti-TcRad51 antibody raised in mouse (diluted 1:2,000) and visualized with Alexa 555 conjugated goat-derived anti-mouse IgG secondary (diluted 1:5,000); black bar: 5 μ m. Cells are also shown in phase contrast but at a lower magnification (white bar: 2 μ m). A graphical representation of fluorescence intensities is shown alongside the images. Vertical bars indicate standard deviation, asterisks represent statistically significant differences ($p < 0.001$, Student's *t*-test, Mann-Whitney post-test) in fluorescence between each time point comparing irradiated to non-irradiated parasites. At least 200 cells were analyzed per coverslip. B) Box-plot of fluorescence intensity of TcRad51 in the nucleus of WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} cells are shown before irradiation (non-irradiated) and at different times (1, 4, 24, 48 and 72h) after 500 Gy of gamma irradiation exposure. Two hundred cells were analyzed per coverslip. Asterisks represent statistically significant differences ($p < 0.001$, *t*-student test with Mann-Whitney post-test) in fluorescence between each time point comparing irradiated to non-irradiated parasites.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g003>

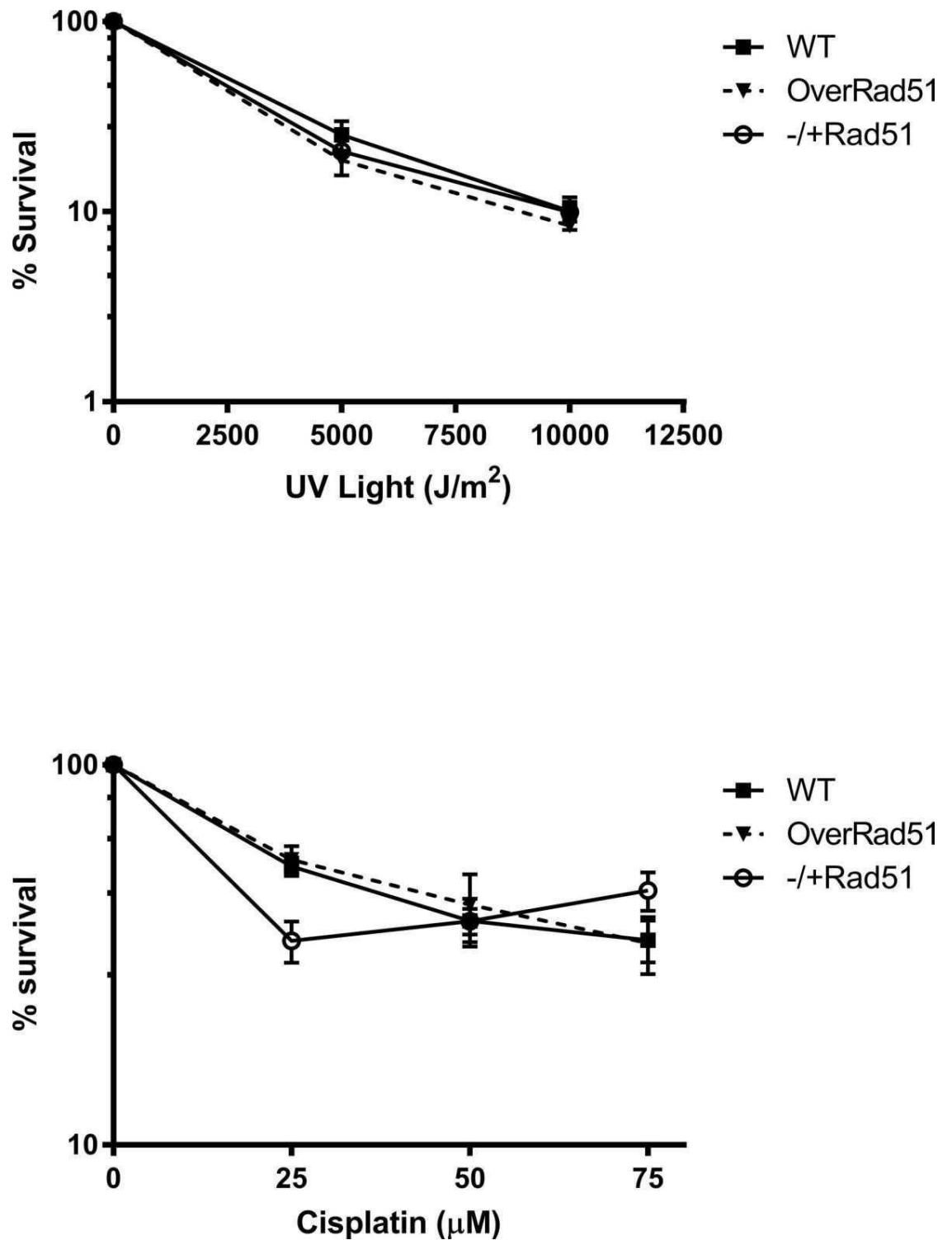


Fig 4. *T. cruzi* response to treatment with DNA cross-linking agents. Sensitivity of WT, TcRAD51^{ox} and TcRAD51^{-/+} cells to: (A) 0, 500 J/m² or 1.000 J/m² of UV-light, or (B) 25 µM, 50 µM or 75 µM cisplatin. Parasites were counted 48 h after treatment. Numbers are represented as a percentage of untreated cells. Values represent the mean of triplicates. Error bars indicate standard deviations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g004>

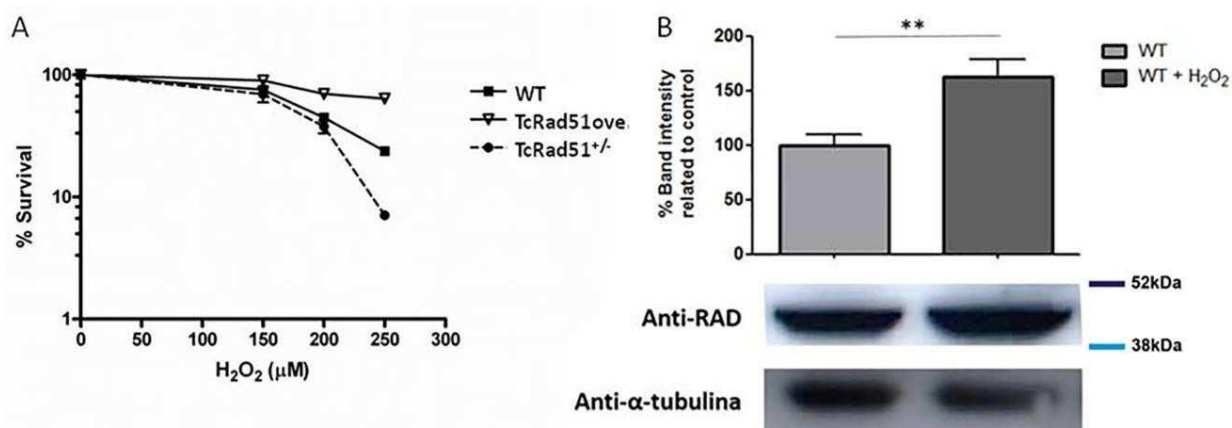


Fig 5. *T. cruzi* response to oxidative stress. (A) The sensitivity of WT, TcRAD51^{ox}, and TcRAD51^{+/-} cells against 150, 200 and 250 μM H₂O₂. Parasites were counted 48 h after treatment. Numbers are represented as a percentage of untreated cells. Values represent the mean of triplicates. Error bars indicate standard deviations. (B) Bar chart representing the detection of TcRad51 protein levels in epimastigotes extracts from WT cultures after treatment with 200 μM of H₂O₂ (performed in triplicate). Cell lysates were separated by SDS-PAGE and proteins were detected by Western blot with anti-TcRad51 (1:2,000) antiserum and peroxidase-conjugated anti-IgG secondary (1:10,000 or 1:12,000). A control showing tubulin levels was detected using mouse anti-Tubulin (1: 12,000) antiserum. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. □□ *p* < 0.01. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g005>

TcRAD51^{ox} cells. The number of intracellular parasites per infected cell was assessed after 24, 48, 72 and 96 h of infection. Fig 6A shows that, during the first 24 h of infection, WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} cells showed a similar pattern of infection, with an approximately equal number of intracellular parasites per infected cell. However, after 24 h of infection, when parasites differentiate to the amastigote form and replicate by binary fission, cells behaved differently. TcRAD51^{+/-} cells showed a significant decrease in growth when compared to WT or TcRAD51^{ox} cells 48 h postinfection (*p* < 0.01 and *p* < 0.001, respectively). Additionally, after 72 h of infection, an increased number of intracellular parasites could be observed in fibroblast cultures infected with TcRAD51^{ox} parasites (*p* < 0.001), while TcRad51^{+/-} cells maintained lower levels of growth; this differential growth pattern was also observed at 96 h of infection. This result demonstrates that TcRad51 levels and parasite intracellular development show a direct relationship as TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} cells presented opposite behavior, reinforcing the importance of TcRad51 for parasite survival and growth in the intracellular environment.

The role of TcRad51 in the infection of macrophages was also studied (Fig 6B). Similarly to results observed in fibroblasts, overexpression of TcRad51 increased the rate of infection of *T. cruzi* in macrophages. After 48 and 72 h of infection, the number of cells infected with TcRAD51^{ox} cells was higher compared to WT and TcRAD51^{+/-}. Also, the infection rate of macrophages with TcRAD51^{+/-} parasites remained low even after 72 h of incubation. These observations confirm results obtained for fibroblast showing that TcRad51 exhibit important roles during *T. cruzi* infection.

TcRad51 levels impact DNA repair and intracellular replication after gamma irradiation in *T. cruzi*

In order to evaluate the expression levels of TcRAD51 in genetically-modified amastigotes, WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} parasites were exposed to 500 Gy of gamma irradiation prior to fibroblast infection. Gamma radiation treatment precluded parasite replication inside fibroblasts for the next 96 h after treatment (Fig 7A). We also analyzed the number of

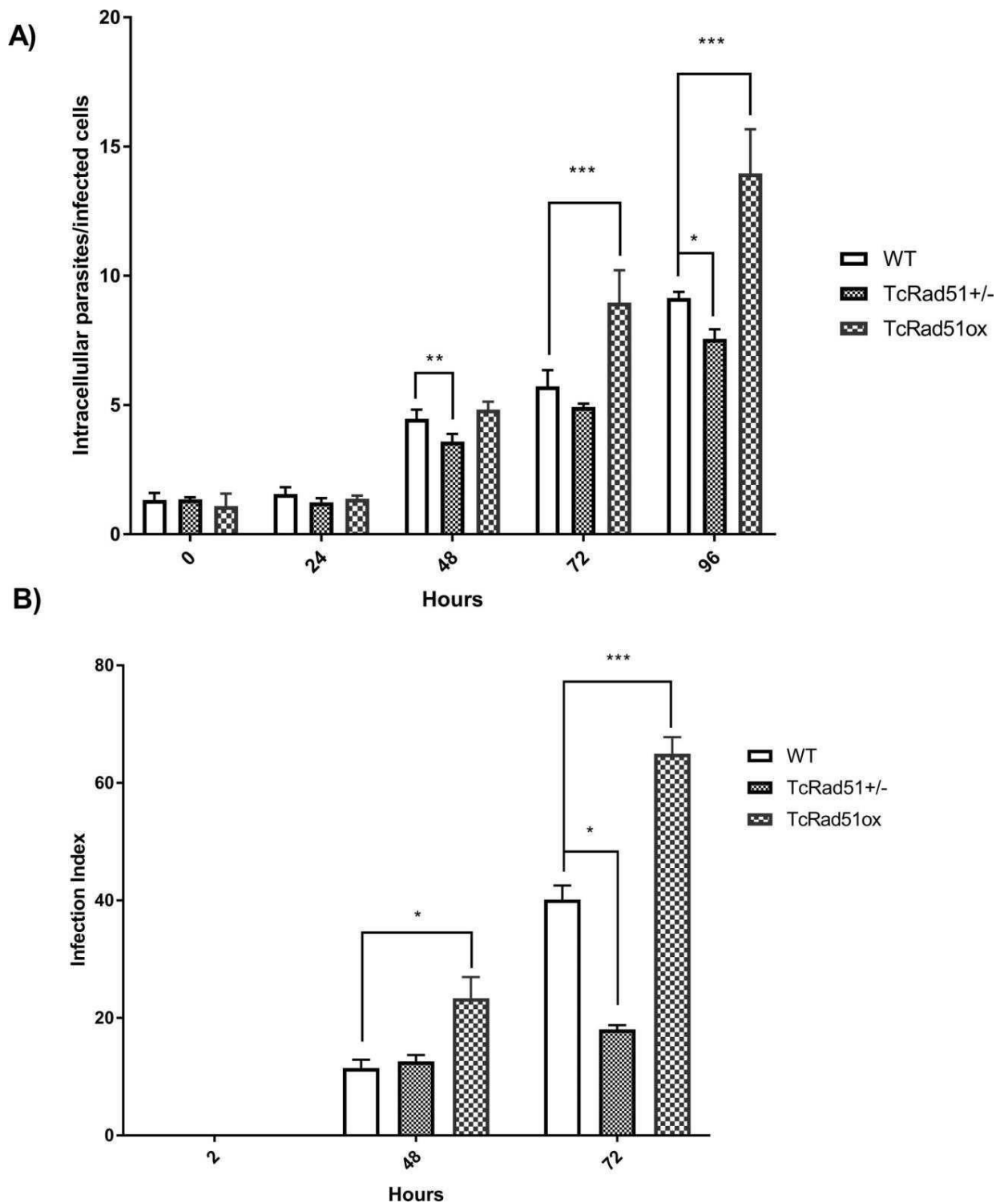


Fig6. TcRAD51 expression levels are related to the intracellular growth of *T. cruzi* in fibroblasts and macrophage cells. Murine fibroblasts were exposed to trypomastigotes (MOI of 50) for 30 min. Monolayers were washed to remove extracellular parasites and either fixed (PFA 4%) or incubated with fresh medium without parasites for different times. Slides were stained by immunofluorescence and analyzed in a fluorescence microscope. A: Number of intracellular parasites per infected cell for WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} infected cultures ranging from 0 up to 96 h post-infection.

Data were analyzed using two-way ANOVA test with Bonferroni post-test ($\square\square\square p < 0.001$, $\square\square p < 0.01$, $\square p < 0.05$). At least 200 fibroblasts were analyzed.

B: Macrophages obtained from the conversion of THP-1 monocytes into macrophages by the addition of PMA and incubated for 72 h were subjected to infection with WT, TcRAD51^{+/-} or TcRAD51^{ox} trypomastigotes (MOI of 15). Cells were washed to remove extracellular parasites, and either fixed or re-incubated with medium for 48 and 72 h. Slides were stained with Giemsa and analyzed to determine the infection index (percentage of infected macrophages multiplied by the average number of amastigotes per macrophage) for each parasite population. At least 300 macrophages were analyzed.

Data were analyzed using two-way ANOVA test with Bonferroni post-test (^{□□□} $p < 0.001$, ^{□□} $p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g006>

trypomastigotes released from fibroblasts over time. Our results show that TcRAD51^{ox} trypomastigotes release is higher than that verified for WT trypomastigotes. On the other hand, no trypomastigote release was observed for gamma irradiated TcRAD51^{+/-} infected cultures during the period of 23 d of infection, after which the cells became unviable (Fig 7B). These results suggest that our genetically-modified cells do not cease to synthesize different quantities of TcRad51 in amastigote form and that the phenotype observed in amastigotes is similar to the epimastigote phenotype after gamma irradiation.

Levels of TcRad51 affect *T. cruzi* infection in mice

In order to evaluate the role of TcRad51 during animal infection, mice were intraperitoneally inoculated with 5,000 *T. cruzi* bloodstream forms of CL Brener WT, TcRAD51^{+/-} or TcRAD51^{ox} cells. As shown in Fig 8A and 8B, the peak of parasitemia in mice infected with WT parasites was verified from the 16th to the 19th day after the infection, as described earlier [30]. Infection of

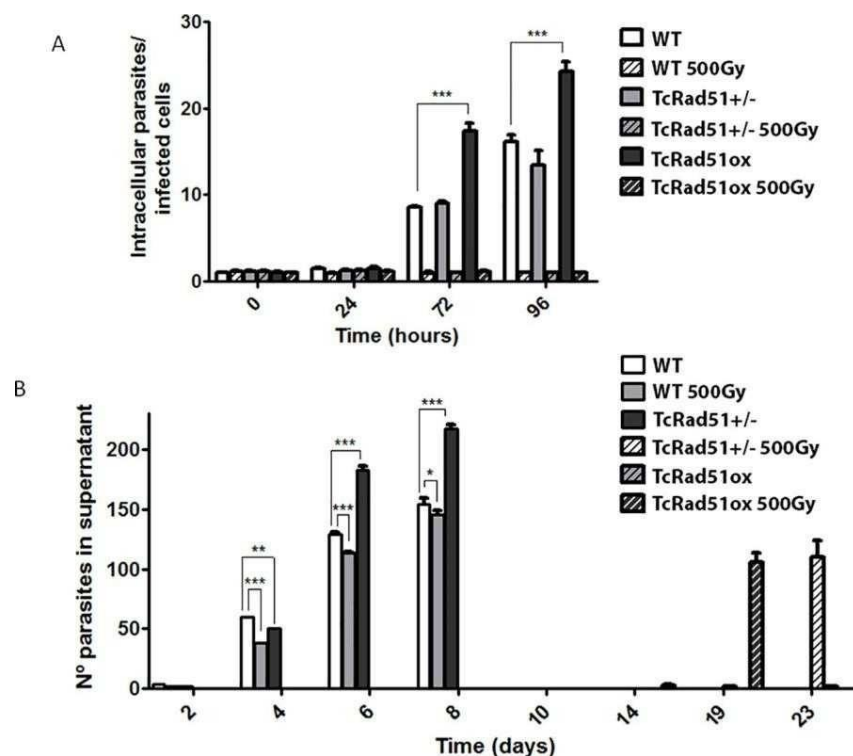


Fig 7. The Intracellular growth of *T. cruzi* after gamma irradiation are related to TcRAD51 expression levels. (A) The number of intracellular parasites in cultures infected with WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} parasites treated or not with 500 Gy of gamma radiation over time. (B) Kinetics of trypomastigote release in cultures infected with WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} parasites treated or not with 500 Gy of gamma irradiation. The number of WT, TcRAD51^{+/-} and TcRAD51^{ox} trypomastigotes in the cellular supernatant after fibroblast exposure to gamma radiation was monitored for 23 d. Data were analyzed using two-way ANOVA test with Bonferroni post-test (^{□□□} $p < 0.001$, ^{□□} $p < 0.01$, [□] $p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g007>

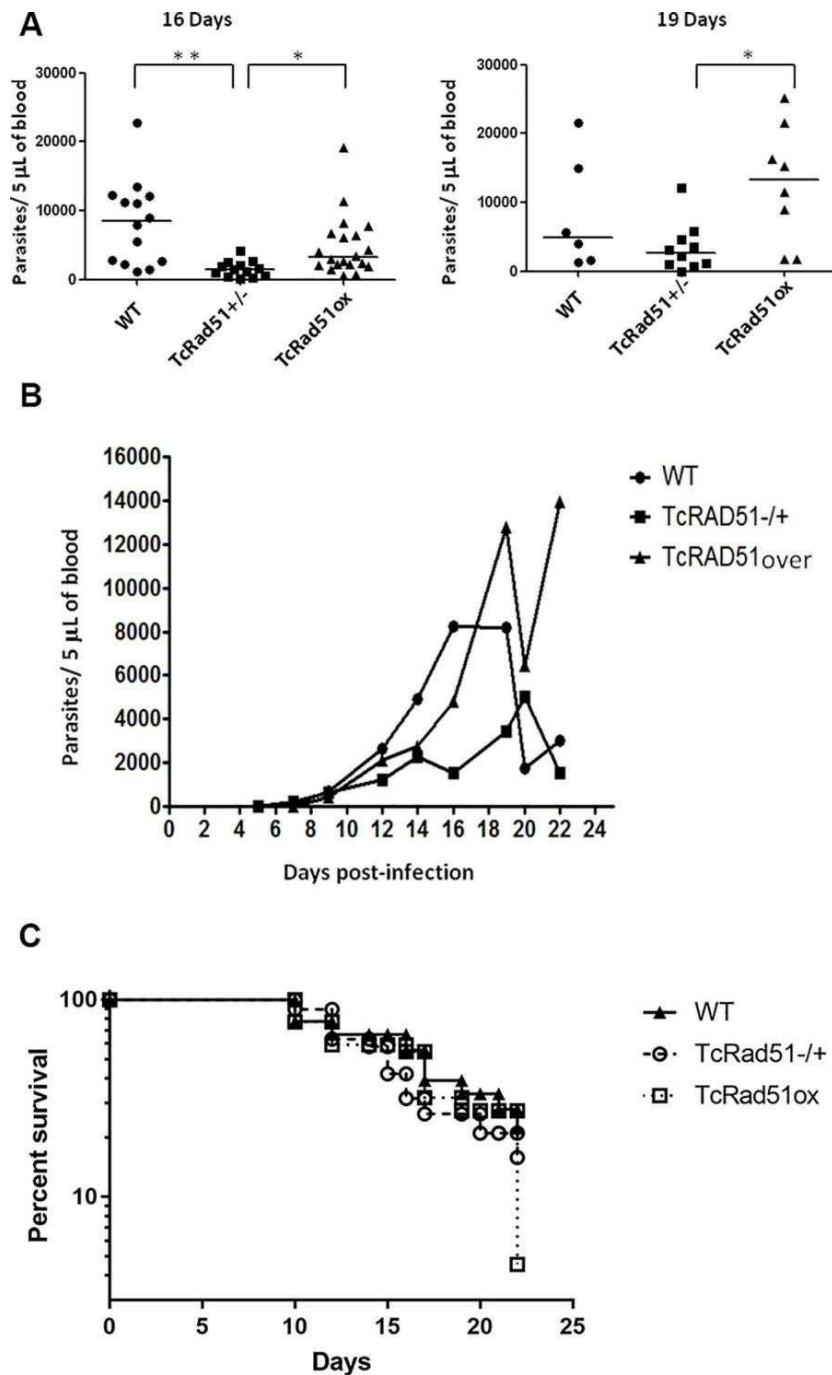


Fig8. Parasitemia from animals infected with WT, TcRAD51^{+/-} or TcRAD51^{ox} parasites. Male Swiss mice were intraperitoneally infected with 5,000 bloodstream forms. Parasitemia was evaluated from the 5th to the 22nd day post-infection by counting blood trypomastigotes collected from mouse's tail. (A) Parasite numbers of each mouse at days 16 and 19 after infection are shown. Horizontal lines indicate the mean of parasite numbers from each *T. cruzi* sample infecting mice. Differences between groups were determined using Kruskal–Wallis test followed by Dunn post hoc test (16th day), or ANOVA test followed by Tukey post hoc test (19th day). Statistically different values are indicated as follows: □ $p < 0.05$, □□ $p < 0.001$. (B) Parasitemia curves from animals infected with CL Brener WT, TcRAD51^{+/-} or TcRAD51^{ox} parasites. Each curve represents the mean of 2 distinct experiments ($n = 19$ to 22 mice per *T. cruzi* group). The mice were infected with 5,000 blood trypomastigotes intraperitoneally. Parasitemia was evaluated from the 5th to the 22nd day after infection. (C) Survival of infected animals exposed with three different strains of *T. cruzi*: WT,

TcRad51^{ox} and TcRad51^{+/-}. Male 3-week old Swiss mice were infected intraperitoneally with 5,000 TCT's. The mortality is presented as a percentage when compared to the control group (mice were injected with saline solution). No statistical difference were observed at the times analyzed, although the overexpressor strain was able to achieve a high mortality at the end time of the experiment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.g008>

TcRAD51^{ox} cells presented a significant delay in its peak, which happened on the 19th day after infection; however, infection with TcRAD51^{ox} cells produced a higher number of parasites compared with mice infected with TcRAD51^{+/-} ($p < 0.05$). Mice infected with TcRAD51^{+/-} showed a decreased peak of parasitemia at 20 d post-infection (Fig 8B). Together, these results show the importance of TcRad51 for the success of *T. cruzi* in infecting the mammalian host.

In addition, mortality rates of mice infected with different *T. cruzi* samples (WT, TcRAD51^{+/-} or TcRAD51^{ox}) were evaluated from the 10th to the 22nd day after infection. Data were analyzed by Fisher's exact test, and no statistically significant difference was observed among the samples analyzed (Fig 8C).

TcRad51 levels affect *T. cruzi* *in vivo* resistance against benznidazole

We previously showed that epimastigote cells overexpressing TcRad51 display increased *in vitro* resistance against benznidazole when compared to WT [31]. To verify whether TcRad51 levels affects *T. cruzi* *in vivo* resistance against benznidazole, parasite's susceptibility to this drug was determined in groups of mice intraperitoneally infected with CL Brener WT, TcRAD51^{ox} or TcRAD51^{+/-} parasites. After 5 d of infection, animals became subject of a 20-day treatment with benznidazole and had blood samples collected for hemoculture. Percentage of cure was analyzed through the presence of parasites. Table 1 shows the percentage of cure induced by benznidazole after long-term treatment of different groups of infected mice. The percentage of cure in mice group infected with WT *T. cruzi* was 92.6%. In contrast, mice infected with TcRAD51^{ox} parasites presented a 50% cure. Then, TcRAD51 overexpression conferred an increase of over 40% in resistance against benznidazole ($p < 0.05$). On the other hand, no statistically significant difference between the percentage of cure between WT and TcRAD51^{+/-} parasites was observed. According to the literature, hemoculture is the best indicator of cure for mice after chemotherapy, and it has been used for analyzing susceptibility *in vivo* of *T. cruzi* strains to benznidazole [32].

Male Swiss mice at 3 weeks of age were intraperitoneally infected with 5,000 *T. cruzi* blood-stream forms. Five days after infection, blood samples of these animals were analyzed, and positive mice were subjected to treatment with benznidazole for 20 consecutive days. Thirty days after treatment, blood cultures were performed. Samples were incubated in BOD greenhouse and analyzed for positivity after 30 and 60 d.

Discussion

Rad51, a strand-exchange protein, is a central player in HR [1]. In this work, we first knocked out one allele of TcRAD51 and examined the phenotypic effects of this mutation. Levels of

Table 1. Percentage cure induced by benznidazole after long-term treatment of mice infected with Cl Brener wild-type, TcRAD51 or TcRAD51 cells.

<i>T. cruzi</i> samples infecting mice	Number of mice	Number of positive mice	Percentage cure
WT	14	1	92.6
TcRAD51 ^{+/-}	14	2	85.7
TcRAD51 ^{over}	12	6	50

[□] $p < 0.05$ vs. mice infected with wild-type parasites. Data were analyzed by Fisher's exact test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875.t001>

TcRad51 have important consequences for growth and infection of *T. cruzi*. We also showed that TcRAD51^{+/-} parasites presented a delayed growth recovery after gamma radiation exposure, in oppose to TcRAD51^{ox} parasites, which recover faster than the WT ones. Second, the same behavior is observed for damage induced by H₂O₂. These two effects are relevant as levels of TcRad51 correlate with growing capacity and infectivity of parasites in mammalian cells, as well as in the animal model, suggesting that HR is required for parasite infectivity.

We also verified that the deletion of one allele of TcRAD51 is sufficient to reduce the rates of TcRad51 foci formation after irradiation, as determined by immunolocalization through fluorescence quantification (Fig 4). Indeed, TcRad51 accumulates in the nucleus after irradiation, initially as foci. The inability to distinguish discreet foci at later time points after irradiation may be due to their increased number and intensity beyond the limits of microscopic detection as protein levels increase, which is consistent with the fact that TcRAD51^{+/-} cells present lower levels of TcRAD51 expression and also showed a delay in foci formation in the nucleus after radiation treatment. Most likely, these data explain the behavior of *T. cruzi* after gamma irradiation, with lowered levels of TcRad51 in the TcRAD51^{+/-} cells causing a delay in DNA repair activity, which will interfere in the time parasites take to overcome growth arrest caused by exposure to ionizing radiation. On the other hand, the higher levels of TcRAD51 expression observed in TcRAD51^{ox} cells, before and after gamma irradiation, can be correlated with a faster both DNA repair and growth recovery after radiation exposure. The presence of TcRad51 even after the repair of chromosomes verified through PFGE (Fig 2) suggests that not all lesions are repaired within 24 h, leading to the observation of populational cellular arrest for longer times. These results confirm that TcRad51 is directly involved in HR for DNA repair. Since *T. cruzi* appears to lack key proteins involved in NHEJ [8], a reaction that has never been described *in vitro* [9] or *in vivo* for other trypanosomes [10,11], HR involving TcRad51 appears to be the pathway that confers resistance to high levels of gamma radiation in *T. cruzi*, as proposed around 30 years ago [7,33]. Nonetheless, the exact recombination strategy *T. cruzi* uses to reassemble its chromosomes, and the reason why this parasite needs such a pathway, require further examination.

We also evaluated the contribution of TcRad51 to the repair of lesions caused by cross-linking agents such as UV light and cisplatin. HR involvement in repairing damage promoted by these agents—which are capable of blocking the replication machinery in other organisms—has been documented [34–37], including a critical role in the regeneration of active replication forks at blocking lesions [38,39]. Interestingly, sensitivity to either UV light or cisplatin were not altered by changing TcRAD51 expression, indicating that TcRad51, and therefore HR, does not play a major role in the repair of lesions caused by these genotoxic agents. In fact, cisplatin forms intra- and inter-strand cross-links, while UVC light mostly causes intra-strand cross-links—primarily cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine 6–4 pyrimidone photo-products [36]. These lesions in DNA can block essential cellular process other than replication, such as transcription [40,41]. In this scenario, the stalling of RNA polymerase triggers the activation of transcription-coupled repair (TCR), which removes lesions located on the transcribed strand of active genes [42]. The genome of *T. cruzi* is highly unusual among eukaryotes, being transcribed into long multigene transcripts with relatively few non-transcribed regions [8]. It seems likely, therefore, that the majority of these lesions will cause a severe block to transcription, and they must be recognized and repaired by TCR. Indeed, recently Machado and colleagues demonstrated, through RNA interference of TCR components in *T. brucei* play a major role in the repair/tolerance of UV lesions and repair of cisplatin lesions [43].

Although UV and cisplatin may generate replicative stress, the importance of TcRad51 in resolving this cellular state is still unknown. Two hypotheses may explain this observation: the

first one relies on the possibility of replication stress generated by these treatments being resolved by other repair pathways; the second one is that the remaining TcRad51 synthesized by TcRAD51^{+/-} cells suffice to effectively deal with this insult. In fact, TcRad51 is not involved in all types of replicative stress response since we did not observe any phenotypic difference after HU treatment (Fig 2C); however, TcRAD51^{-/+} parasites are also more sensitive to MMS (Fig 2D). This difference could be due to the lack of DNA damage in HU-treated cells, whereas MMS generates DNA lesions that could not be passed by replicative DNA polymerases. In fact, using an antibody against gamma histone 2A, a marker for DNA double-strand breaks [21], we were able to observe an increased number of DNA lesions in TcRAD51^{-/+} cells after with MMS, but not after HU treatment when compared to WT cells (Fig 2E and 2F). Therefore, TcRAD51 may be involved only in some types of replicative stress [44].

Thus, cross-link lesions may be repaired or tolerated before DNA replication, meaning that TcRad51 would be minimally involved in the repair. In this regard, studies in *T. brucei* have shown that homozygous mutants of RAD51 are similarly unaffected in sensitivity to UV light lesions [6] or cisplatin (S4Fig), suggesting that the strategy for tackling cross-link damage may be kinetoplastid-wide.

Although TcRad51 does not appear to contribute to cross-link repair, we showed that this protein is important to deal with the oxidative damage. Overexpression of TcRAD51 increases resistance against H₂O₂, while the deletion of one allele of TcRAD51 increases sensitivity to this oxidant compound (Fig 6). H₂O₂ is an oxidative agent that primarily causes DNA base damage, including single-strand breaks, base loss and the generation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxoG) [45,46]. Treatment with H₂O₂ increases TcRad51 protein level in WT cells, which reinforces the importance of the HR repair pathway in response to oxidative stress. Many studies, as reviewed in [47], have reported that one of the main lesions produced by H₂O₂, 8-oxoguanine, blocks the transcription machinery only in a few specific DNA sequence contexts that cause helix distortion. Thus, TCR is unlikely to be activated by oxidative damage and not repaired until S phase, when it will block the replication fork. This stalled replication fork can be a substrate for TcRad51, and this protein will allow HR to repair DNA damage so that DNA replication can be resumed. This repairing reaction is necessary to eliminate lesions that impede fork progression, in order to avoid fork collapse and allow forks to resume and complete chromosome replication [48,49]. Therefore, it seems likely that TcRad51 mediates the resistance against oxidative damage to DNA through the repair of DNA damage during replication. The data we provide here on TcRad51 add to a growing body of evidence that trypanosomatids use many pathways are needed to cope with oxidative damage, including some other repair pathways, most notably mismatch repair [50,51].

Since TcRad51 is important for *T. cruzi*'s response to oxidative stress to which this parasite is exposed during its life cycle, the relevance of TcRad51 and the HR pathway for *T. cruzi* both intracellular replication and survival inside the cell host was also evaluated in this work. Aiming to confirm that genetic modifications of TcRAD51 (i.e, single allele knock out and overexpression) would be stable in the amastigote form, we irradiated trypomastigote forms before the infection, and then we followed the growth of the amastigotes in fibroblast cells. Irradiated parasites showed a similar phenotype to that one observed for epimastigote forms, i.e, a delay in the cellular growth. Additionally, TcRAD51^{ox} parasites recovered growth faster than WT cells. Non-irradiated TcRAD51^{ox} parasites also presented enhanced multiplication inside fibroblasts, and TcRAD51^{+/-} parasites showed decreased growth when compared to WT.

After confirming the stability of the genetic modifications of TcRAD51, we analyzed the infectivity of the modified cells in fibroblast and macrophage cells. In these both types of cells, we verified that TcRAD51^{ox} parasites exhibited an increased growth and that TcRAD51^{-/+} showed a decreased growth when compared to WT cells; however, these differences are more

accentuated in macrophage cells. The role of TcRad51 in intracellular multiplication could be attributed to DNA repair in response against oxidative lesions. Gupta and colleagues [52] demonstrated that, during *T. cruzi* invasion and intracellular growth in cardiomyocytes, an exacerbated reactive oxygen species production occurs in the host cell cytoplasm, being detected 2 h post-infection, and showing an exponentially increase until 48 h post-infection, fact that correlates with our findings that growth differences between the *T. cruzi* strains were observed after 48 h of infection. Further evidence is provided by examination of a *T. cruzi* that overexpress the TcMutT gene, which results in an increase in the number of amastigotes, which occurs with the same kinetics seen for TcRAD51^{ox} parasites [30]. MutT is responsible for removing 8-oxo-dGTP from the nucleotide pool; this lesion is considered particularly deleterious because it could generate DNA double-strand breaks if it is not properly repaired [53]. The increased TcRAD51^{+/-} sensitivity in macrophages could be related to the level of oxidative stress produced by this kind of cell when compared to fibroblasts. The curve in the presence of H₂O₂ (Fig 5) showed that TcRAD51^{+/-} parasites are more sensitive than WT ones to this drug only in high doses, which suggests that the level of TcRad51 in TcRAD51^{+/-} is sufficient to deal with the damage caused by low doses of oxidative stress.

The importance of TcRad51 to infection was not limited to *in vitro* models. Although TcRAD51^{ox} parasites show a delay in the peak of parasitemia in mice compared to WT cells, all the mice infected the TcRAD51^{ox} *T. cruzi* presented an increased number of parasites in the bloodstream, most likely in consequence of increased intracellular replication. Moreover, TcRAD51^{+/-} parasites showed lower parasitemia throughout, and no parasitemic peak, indicating that loss of only a single allele is detrimental to *in vivo* survival. Interestingly, although infection with TcRAD51^{+/-}, TcRAD51^{ox}, and WT *T. cruzi* led to different levels of parasites in the bloodstream of mice (Fig 8A and 8B), infected animals did not exhibit a parasitemia-dependent rate of mortality (Fig 8C), showing that parasitemia itself does not determine host mortality. Finally, recent work from our group that showed that TcRad51 could be involved with the resistance to benznidazole *in vitro* [31]. In fact, we demonstrated here that TcRad51 is also involved in resistance to this drug *in vivo*, since overexpression of TcRAD51 caused an increased resistance to benznidazole, decreasing the rate of cure in mice infected with TcRAD51^{ox} parasites. It is possible that benznidazole could generate 8-oxo-dGTP and, as described above, an inappropriate repair of this lesion could generate a DSB that will be substrate to the HR pathway. Therefore, TcRad51 could be an important protein for *T. cruzi*'s metabolism, since it is well established that HR repair becomes very efficient if a template is present when compared to MMEJ [54–56].

In summary, our results suggest that TcRad51, and thereby HR, has a pivotal role in *T. cruzi* genome maintenance in a number of stages of the parasite life cycle. Moreover, this key protein for HR is involved in the repair of DSBs and oxidative lesions in *T. cruzi*, being crucial for parasite's survival and persistence during mammalian infection.

Supporting information

S1 Fig. DNA sequencing containing ~700pb, which includes the beginning of the hygromycin gene, the 500pb region upstream of the Rad51 gene and the region beyond the cloned cassette. The comparison is made between the remaining wild-type allele, the annotated sequence in the TrypDB database and the Hygromycin gene used in the construction. In blue: the upstream region to the top of the vector used in cloning. In red: the beginning of the coding sequence of Rad51. In green: the start of the hygromycin phosphotransferase sequence. (TIF)

S2 Fig. A) *T. cruzi* growth curve after treatment with 30 mM HU. B) *T. cruzi* growth curve after treatment with 10 mM HU. For both panels, the arrow indicates the point when the drug was removed.

(TIF)

S3 Fig. Kinetics of nuclei-localized TcRad51 in WT, TcRAD51^{+/+}, and TcRAD51^{ox} cells are shown. TcRad51 was detected using anti-TcRad51 antibody raised in mouse (diluted 1:2,000) and visualized with Alexa 555 conjugated goat-derived anti-mouse IgG secondary (diluted 1:5,000). DNA is shown stained with DAPI (blue).

(TIF)

S4 Fig. Sensitivity of WT and TcRAD51^{+/+} cells to 1.7, 3.3 and 5 μ M of cisplatin. Parasites were counted 48 h after treatment. Numbers are represented as a percentage of untreated cells. Values represent the mean of triplicates. Error bars indicate standard deviations.

(TIF)

Acknowledgments

We are grateful to Neuza Antunes Rodrigues for technical support. Authors also thank the Program for Technological Development of Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

Author Contributions

Conceptualization: Danielle Gomes Passos Silva, Glória Regina Franco, Andrea Mara Macedo, Erich Birelli Tahara, Richard McCulloch, Sergio Schenkman, Luciana Oliveira Andrade, Silvane Maria Fonseca Murta, Carlos Renato Machado.

Formal analysis: Danielle Gomes Passos Silva, Selma da Silva Santos, Sheila C. Nardelli, Isabela Cecília Mendes, Anna Cláudia Guimarães Freire, Bruno Marçal Repolês, Bruno Carvalho Resende, Héliida Marina Costa-Silva, Karla Andrade de Oliveira, Glória Regina Franco, Policarpo Ademar Sales Junior, Douglas Souza Moreira, Richard McCulloch, Stela Virgilio, Luiz Ricardo Orsini Tosi, Sergio Schenkman, Luciana Oliveira Andrade, Silvane Maria Fonseca Murta, Carlos Renato Machado.

Funding acquisition: Glória Regina Franco, Andrea Mara Macedo, Sergio Danilo Junho Pena, Erich Birelli Tahara, Carlos Renato Machado.

Investigation: Danielle Gomes Passos Silva, Selma da Silva Santos, Sheila C. Nardelli, Isabela Cecília Mendes, Anna Cláudia Guimarães Freire, Bruno Marçal Repolês, Bruno Carvalho Resende, Héliida Marina Costa-Silva, Verônica Santana da Silva, Karla Andrade de Oliveira, Camila Franco Batista Oliveira, Policarpo Ademar Sales Junior, Douglas Souza Moreira, Stela Virgilio, Luiz Ricardo Orsini Tosi.

Methodology: Camila Franco Batista Oliveira, Liza Figueiredo Felicori Vilela, Ronaldo Alves Pinto Nagem, Silvane Maria Fonseca Murta, Carlos Renato Machado.

Resources: Liza Figueiredo Felicori Vilela, Ronaldo Alves Pinto Nagem, Glória Regina Franco, Sergio Danilo Junho Pena, Erich Birelli Tahara, Santuza Maria Ribeiro Teixeira, Sergio Schenkman, Luciana Oliveira Andrade, Silvane Maria Fonseca Murta, Carlos Renato Machado.

Writing – original draft: Danielle Gomes Passos Silva, Selma da Silva Santos, Richard McCulloch, Luciana Oliveira Andrade, Silvane Maria Fonseca Murta, Carlos Renato Machado.

Writing – review & editing: Bruno Marçal Repolês, Bruno Carvalho Resende, Héliida Marina Costa-Silva, Erich Birelli Tahara, Richard McCulloch, Sergio Schenkman, Luciana Oliveira Andrade, Silvano Maria Fonseca Murta, Carlos Renato Machado.

References

1. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*. 2012. pp. 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270> PMID: [22467216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22467216/)
 2. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol Cell*. Elsevier; 2012; 47: 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029> PMID: [22920291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22920291/)
 3. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 435–445. <https://doi.org/10.1038/nrm1127> PMID: [12778123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12778123/)
 4. 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 Res*. 1998; 26: 2859–2864. <https://doi.org/10.1093/nar/26.12.2859> PMID: [9611228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9611228/)
 5. Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*. 1992; 69: 457–470. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90447-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90447-K) PMID: [1581961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1581961/)
 6. McCulloch R, Barry JD. A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev*. 1999; 13: 2875–2888. <https://doi.org/10.1101/gad.13.21.2875> PMID: [10557214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10557214/)
 7. Regis-da-Silva CG, Freitas JM, Passos-Silva DG, Furtado C, Augusto-Pinto L, Pereira MT, et al. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol Biochem Parasitol*. 2006; 149: 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.012> PMID: [16828179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16828179/)
 8. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005; 309: 409–15. <https://doi.org/10.1126/science.1112631> PMID: [16020725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020725/)
 9. Burton P, McBride DJ, Wilkes JM, Barry JD, McCulloch R. Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryot Cell*. 2007; 6: 1773–1781. <https://doi.org/10.1128/EC.00212-07> PMID: [17693593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17693593/)
 10. Conway C, Proudfoot C, Burton P, Barry JD, McCulloch R. Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*. 2002; 45: 1687–1700. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03122.x> PMID: [12354234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12354234/)
 11. Glover L, McCulloch R, Horn D. Sequence homology and microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: 2608–2618. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn104> PMID: [18334531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18334531/)
 12. McKean PG, Keen JK, Smith DF, Benson FE. Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 115: 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00288-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00288-2) PMID: [11420107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420107/)
 13. Organization WH. Media Center: Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. 2014 [cited 25 Aug 2014]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#>
 14. Buchmeier NA, Lipps CJ, So MYH, Heffron F. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol Microbiol*. 1993; 7: 933–936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01184.x> PMID: [8387147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8387147/)
 15. Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2010; 285: 11596–11606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076984> PMID: [20145242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20145242/)
 16. Paes MC, Cosentino-Gomes D, Souza CF De, Nogueira NPDA, Meyer-Fernandes JR. The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/174614> PMID: [22007287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22007287/)
 17. Garcia ES, Genta FA, De Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of tritamines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*. 2010. pp. 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.003> PMID: [20801082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20801082/)
 18. Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. *J Exp Med*. 2004; 200: 1135–1143. <https://doi.org/10.1084/jem.20041408> PMID: [15520245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15520245/)
-

-
19. DaRocha WD, Silva R a, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res.* 2004; 92: 113–20. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1004-5> PMID: [14634799](#)
 20. Gomes M, Araujo S, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: growth of clones on solid medium using culture and blood forms. *Memórias do Inst Oswaldo* 1991; 86: 131–132.
 21. Stortz JA, Serafim TD, Alsford S, Wilkes J, Fernandez-Cortes F, Hamilton G, et al. Genome-wide and protein kinase-focused RNAi screens reveal conserved and novel damage response pathways in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 2017; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006477> PMID: [28742144](#)
 22. Murta SMF, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FFM, Probst CM, Ávila AR, et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benzimidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 146: 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.001> PMID: [16442642](#)
 23. Albertti LAG, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect.* 2010; 12: 784–789. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.015> PMID: [20561595](#)
 24. Andrews NW, Hong K su, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 1987; 64: 474–484. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90062-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90062-2) PMID: [3315736](#)
 25. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop.* 1962; 389–396.
 26. Nikolova T, Ensminger M, Löbrich M, Kaina B. Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methylmethanesulfonate. *DNA Repair (Amst).* 2010; 9: 1050–1063. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.07.005> PMID: [20708982](#)
 27. Proudfoot C, McCulloch R. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 6906–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gki996> PMID: [16326865](#)
 28. Davis AP, Symington LS. RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 2344–51. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.6.2344-2351.2004> PMID: [14993274](#)
 29. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res—Fundam Mol Mech Mutagen.* 2003; 531: 231–251. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002>
 30. Aguiar PHN, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, Mendes IC, Peloso EF, et al. Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002279> PMID: [23785540](#)
 31. Raj??o MA, Furtado C, Alves CL, Passos-Silva DG, De Moura MB, Schamber-Reis BL, et al. Unveiling Benzimidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environ Mol Mutagen.* 2014; 55: 309–321. <https://doi.org/10.1002/em.21839> PMID: [24347026](#)
 32. Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari Ca. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22: 19–23. PMID: [2517801](#)
 33. Takeda G, Campos R, Kieffer J, Moreira AA, Amato Neto V, Castilho VL, et al. Ação de raios gama sobre formas sanguíneas de *trypanosoma cruzi*. estudo experimental em camundongos. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1986; 28: 15–18. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000100004> PMID: [3094131](#)
 34. Aboussekhra A, Al-Sharif IS. Homologous recombination is involved in transcription-coupled repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2005; 24: 1999–2010. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600665> PMID: [15902273](#)
 35. Coïc E, Feldman T, Landman AS, Haber JE. Mechanisms of Rad52-independent spontaneous and UV-induced mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2008; 179: 199–211. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.087189> PMID: [18458103](#)
 36. Keller KL, Overbeck-Carrick TL, Beck DJ. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat Res—DNA Repair.* 2001; 486: 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00077-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00077-5) PMID: [11356333](#)
 37. Raaphorst GP, Li LF, Yang DP. Evaluation of adaptive responses to cisplatin in normal and mutant cell lines with mutations in recombination repair pathways. *Anticancer Res.* 2006; 26: 1183–1187. PMID: [16619522](#)
 38. Cox MM. Recombinational DNA Repair of Damaged Replication Forks in *Escherichia coli*: Questions. *Annu Rev Genet.* 2001; 35: 53–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090016> PMID: [11700277](#)
-

-
39. McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC. Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell*. 2005; 20: 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.001> PMID: [16337601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16337601/)
 40. Mitchell DL. The relative cytotoxicity of (6–4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci*. 1988; 51–57.
 41. Tremeau-Bravard A, Riedl T, Egly JM, Dahmus ME. Fate of RNA Polymerase II Stalled at a Cisplatin Lesion. *JBiol Chem*. 2004; 279: 7751–7759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309853200> PMID: [14672951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14672951/)
 42. Hoeijmakers JHJ. Genomemaintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 411: 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232> PMID: [11357144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11357144/)
 43. Machado CR, Vieira-da-Rocha JP, Mendes IC, Rajão MA, Marcello L, Bitar M, et al. Nucleotide excision repair in *Trypanosoma brucei*: Specialization of transcription-coupled repair due to multigenic transcription. *Mol Microbiol*. 2014; 92: 756–776. <https://doi.org/10.1111/mmi.12589> PMID: [24661334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24661334/)
 44. Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, et al. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol*. 2012; 14: 966–976. <https://doi.org/10.1038/ncb2549> PMID: [22842922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22842922/)
 45. Letavayová L, Marková E, Hermanská K, Vlcková V, Vlasáková D, Chovanec M, 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 (Amst)*. 2006; 5: 602–10. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.01.004> PMID: [16515894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16515894/)
 46. Stohl EA, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *JBacteriol*. 2006; 188: 7645–7651. <https://doi.org/10.1128/JB.00801-06> PMID: [16936020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16936020/)
 47. 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*. 2007; 22: 343–351. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem024> PMID: [17630408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17630408/)
 48. Kraus E, Leung WY, Haber JE. Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 8255–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.151008198> PMID: [11459961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11459961/)
 49. Michel B, Flores M-J, Viguera E, Grompone G, Seigneur M, Bidnenko V. Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98: 8181–8188. <https://doi.org/10.1073/pnas.111008798> PMID: [11459951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11459951/)
 50. Campos PC, Silva VG, Furtado C, MacHado-Silva A, Darocha WD, Peloso EF, et al. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Mol Biochem Parasitol*. 2011; 176: 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.001> PMID: [21073906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21073906/)
 51. Grazielle-Silva V, Zeb TF, Bolderson J, Campos PC, Miranda JB, Alves CL, et al. Distinct phenotypes caused by mutation of MSH2 in trypanosome insect and mammalian life cycle forms are associated with parasite adaptation to oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003870> PMID: [26083967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26083967/)
 52. Gupta S, Bhatia V, Wen JJ, Wu Y, Huang MH, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic Biol* 2009; 47: 1414–1421. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.008> PMID: [19381111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19381111/)
 53. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. *Science (80-)*. 2012; 336: 315–319. <https://doi.org/10.1126/science.1219192> PMID: [22517853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22517853/)
 54. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL, Peng Duo Kurup, Yao Samarchith P., Minning Phil Y., Todd A. Tarleton RL. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio*. 2014; 6: 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14> Editor
 55. Chiurillo MA, Moraes Barros RR, Souza RT, Marini MM, Antonio CR, Cortez DR, et al. Subtelomeric I-SceI-Mediated Double-Strand Breaks Are Repaired by Homologous Recombination in *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol*. 2016; 7: 2041. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02041> PMID: [28066363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28066363/)
 56. Lander N, Li ZH, Niyogi S, Docampo R. CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *MBio*. 2015; 6: <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-15> PMID: [26199333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26199333/)
-

8.3: The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*

Received: 9 March 2018

Accepted: 16 August 2018

Published online: 06 September 2018

Ceres Luciana Alves¹, Bruno Marçal Repolês¹, Marcelo Santos da Silva^{1,2},
Isabela Cecília Mendes¹, Paula Andrea Marin², Pedro Henrique Nascimento Aguiar¹,
Selma da Silva Santos¹, Glória Regina Franco¹, Andréa Mara Macedo¹,
Sérgio Danilo Junho Pena¹, Luciana de Oliveira Andrade³, Alessandra Aparecida Guarneri⁴,
Erich Birelli Tahara¹, Maria Carolina Elias² & Carlos Renato Machado¹

Detection of genetic exchange has been a limiting factor to deepen the knowledge on the mechanisms by which *Trypanosoma cruzi* is able to generate progeny and genetic diversity. Here we show that incorporation of halogenated thymidine analogues, followed by immunostaining, is a reliable method not only to detect *T. cruzi* fused-cell hybrids, but also to quantify their percentage in populations of this parasite. Through this approach, we were able to detect and quantify fused-cell hybrids of *T. cruzi* clones CL Brener and Y. Given the increased detection of fused-cell hybrids in naturally-occurring hybrid CL Brener strain, which displays increased levels of RAD51 and BRCA2 transcripts, we further investigated the role of Rad51 – a recombinase involved in homologous recombination – in the process of genetic exchange. We also verified that the detection of fused-cell hybrids in *T. cruzi* overexpressing RAD51 is increased when compared to wild-type cells, suggesting a key role for Rad51 either in the formation or in the stabilization of fused-cell hybrids in this organism.

The parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which is present in more than twenty countries in the Americas, currently affecting eight to ten million people¹. Similarly to other members of the Trypanosomatidae family, *T. cruzi* is a pathogen that exhibits a complex life cycle, involving both vertebrate and invertebrate hosts^{2,3}.

Since the discovery of Chagas disease, there have been heated debates on *T. cruzi* reproductive mode as it is not well established yet if its progeny is generated by preponderate clonal evolution, or if cryptic events of genetic exchange promoted by sexual reproduction – which would lead to the occurrence of natural hybrids – could possibly play a role in this process. In fact, despite of various studies on the topic, many fundamental aspects about the mechanisms by which *T. cruzi* cells reproduce remain unknown to date^{4,5}.

It is well accepted that the wide array of clinical manifestations of Chagas disease is related to hosts genetics and environment factors, as well as to the great genetic variability observed among *T. cruzi* genetic groups⁶. Currently, these genetic groups are divided into six discrete typing units (DTUs), or clades, namely TcI to TcVI. The *T. cruzi* classification in DTUs is based on molecular markers, geographic distribution, epidemiological associations, and clinical manifestations^{7–10}. Interestingly, with the attempt to clarify the evolutionary relations between all these groups, evidence was found suggesting the natural occurrence of genetic exchange in some of them. TcV and TcVI were identified as hybrids originated from TcII and TcIII^{4,11–14}. Moreover, back in 2003, Gaunt *et al.* were able to identify events of genetic exchange by detecting the presence of *T. cruzi* fused-cell hybrids isolated from the mammalian host carrying two different drug-resistance markers (neomycin and hygromycin B), each one coming from distinct populations of *T. cruzi*¹², suggesting that genetic exchange could take place in specific life cycle phases¹². However, it is not clear yet if the mechanisms of such genetic exchange in

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Laboratório Especial de Ciclo Celular, Centro de Toxinas, Resposta Imune e Sinalização Celular, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ³Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. ⁴Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil. Ceres Luciana Alves, Bruno Marçal Repolês and Marcelo Santos da Silva contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R.M. (email: crmachad@icb.ufmg.br)

T. cruzi are similar to those observed in other parasites such as *Leishmania* and *T. brucei*, which present sexual recombination driven by meiosis^{15,16}.

Mechanisms of reproduction and the extent of clonality of a variety of organisms have been addressed¹⁷. Currently, although mechanisms of genetic exchange during lifecycle are believed to be essential to provide the progeny genetic variability which confers adaptability to the environment¹⁸, there are no consensus to which extent this phenomenon may influence the population genetics of a given species. Based on studies relying on linkage disequilibrium and Hardy-Weinberg deviations, a model of clonal reproduction with rare events of genetic recombination is accepted to explain genetic exchange in this trypanosomatid^{9,18–23}. Also, recent investigations about genetic exchange in *T. cruzi* have provided insights about its impact onto populations of this parasite: analysis using allele frequency and haplotype networks in different loci of isolated *T. cruzi* populations from the Brazilian state of Minas Gerais demonstrated that genetic exchange may be more frequent than originally expected as a linkage disequilibrium was found in Latin-American populations of *T. cruzi* opposed to other small geographic areas⁹; also, investigation using 49 microsatellites loci demonstrated the existence of an excess of heterozygosity for some *T. cruzi* DTU's^{24,25}. The same was observed in a study using isolates from Ecuador, which described linkage disequilibrium in physically linked loci²⁶. In fact, there is sufficient evidence to support the occurrence of genetic recombination in laboratory and free-living *T. cruzi* strains, as recently revised by Messenger and Miles⁴.

However, trypanosomatids predominantly reproduce by clonal generation through longitudinal binary fission, and not through sexual reproduction; in this sense, mutations and parasexual exchange are currently the most parsimonious models to explain genetic variability in *T. cruzi*⁴. Interestingly, parasexual exchange has already been described in some fungi²⁷, and is characterized by DNA exchange that allows genetic recombination without either meiosis, or gamete formation, or even the necessity of fertilization. Since there is no demonstration of gamete formation in *T. cruzi* so far, parasexual reproduction could be important for the heterogeneity observed amongst different populations of this parasite – indeed, a recent analysis of 45 sequenced *T. cruzi* genomes from TcI DTU shows that both clonal expansion and parasexual reproduction are important to provide genetic variability²⁸.

A major mechanism that could be co-related to the parasexual exchange is homologous recombination (HR), which can occur throughout the genome²⁹. In fact, HR is able to produce new combinations of nucleotide sequences, generating genetic diversity and, in some cases, cell hybrids^{30–32}. In addition, HR is the most important pathway for *T. cruzi* to cope with DNA double-strand breaks (DSBs) as essential proteins for the non-homologous end joining pathway have not been identified in the genome of this organism³². Interestingly, *T. cruzi* presents a high resistance against ionizing radiation, a genotoxic agent which is an important source of DSBs^{33,34} this peculiar phenotype most certainly a consequence of an efficient HR DNA repair pathway^{34–36}. One important protein involved in this pathway is the recombinase Rad51, whose role is to search for homology during the DNA repair process³⁷. In fact, in mammalian cells, once the genomic lesion is recognized, (i) DNA ends are processed by the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex, (ii) oligomers of Rad51 are disrupted by BRC domains found in tumor suppressor gene BRCA2, and then (iii) Rad51 is loaded onto single-stranded DNA, being the formation of this nucleoprotein filament one of the essential steps to repair DSBs^{37,38}. Also, it has already been demonstrated that the overexpression of Rad51 in *T. cruzi* can alter the dynamic of DNA repair conducted by HR: after being exposed to the dose of 500 Gy of ionizing gamma radiation, *T. cruzi* cells overexpressing RAD51 are able to resume their cellular growth earlier than wild-type cells; this phenotype is probably related to the enhanced capability that RAD51-overexpressing parasites exhibit to repair DSBs generated by this genotoxic agent³⁵.

In this study, we show that naturally-occurring hybrid *T. cruzi* clone CL Brener presented decreased cellular arrest in response to ionizing irradiation, higher basal levels of RAD51 and BRCA2 transcripts, and increased detection of cellular genetic exchange when compared to naturally-occurring non-hybrids. In addition, we show that overexpression of RAD51 in *T. cruzi* further increased the detection of fused-cell hybrids, which present higher ploidy, impaired growth rate, but decreased cellular arrest due to ionizing radiation. Collectively, our data suggest that the HR pathway, through the activity of the recombinase Rad51, is involved either in the formation or in the stabilization of *T. cruzi* fused-cell hybrids, playing an important role to the generation of intraspecific variability and environmental adaptation of this trypanosomatid.

Results

Naturally-occurring *T. cruzi* hybrids present improved response against ionizing radiation, and increased levels of RAD51 and BRCA2 transcripts. One of the biological effects promoted by ionizing radiation is the generation of DNA DSBs³³. It is known that epimastigotes of *T. cruzi* clone CL Brener – naturally-occurring hybrids – survive to doses of ionizing radiation as high as 1500 Gy, and, after being exposed to the dose of 500 Gy, remain in lag phase for 10 days – at the end of which they resume their replicative growth, even though the majority of damaged DNA gets repaired after 48 h³⁵. In order to verify whether the elapsed time taken to resume *T. cruzi* logarithmic growth upon exposure to ionizing radiation differed between naturally-occurring non-hybrid strains and CL Brener – this may indicate the existence of intra-specific variations with regard to the efficiency of DNA repair processes in this parasite –, we treated epimastigotes from naturally-occurring non-hybrid strains – namely Sylvio (TcI) and Esmeraldo (TcII) – in parallel with epimastigotes from CL Brener strain with the dose of 500 Gy of ionizing radiation. As shown in Fig. 1, all three strains presented a stationary phase following irradiation; however, unlike CL Brener epimastigotes, which resumed their cellular growth after 10 days as previously described^{34–36}, Sylvio and Esmeraldo epimastigotes exhibited longer stationary phases as their cellular growth resumed only 15 days after exposure to ionizing radiation, showing that CL Brener cells present decreased cellular growth arrest in response to genotoxicity. The same growth recovery pattern was observed when other naturally-occurring hybrid strain Bug2149 c110 (TcV), and non-hybrid strains Dm28c (TcI) and Y (TcII) were analyzed (S1 Fig.).

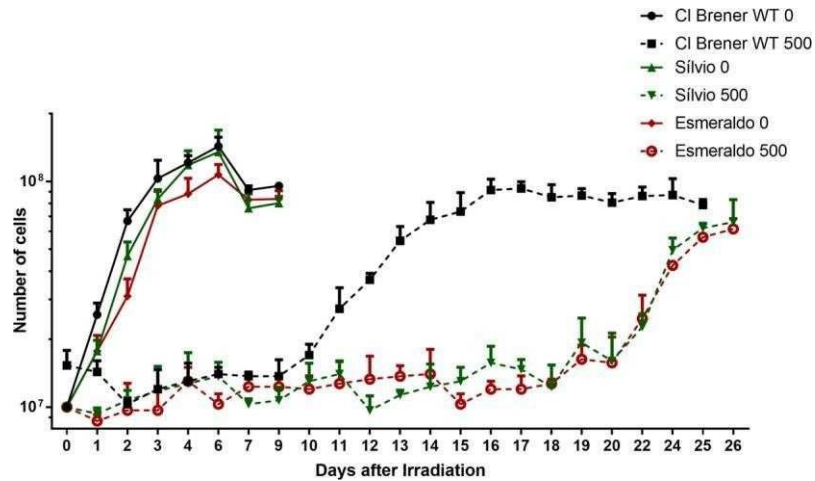


Figure 1. Naturally-occurring *T. cruzi* hybrids present improved response against ionizing radiation. CL Brener, Esmeraldo and Silvio epimastigotes were exposed to 500 Gy of ionizing radiation, which generate DNA DSBs. The naturally-occurring hybrid CL Brener strain showed decreased cellular growth arrest when compared to naturally-occurring non-hybrid strains Esmeraldo and Silvio.

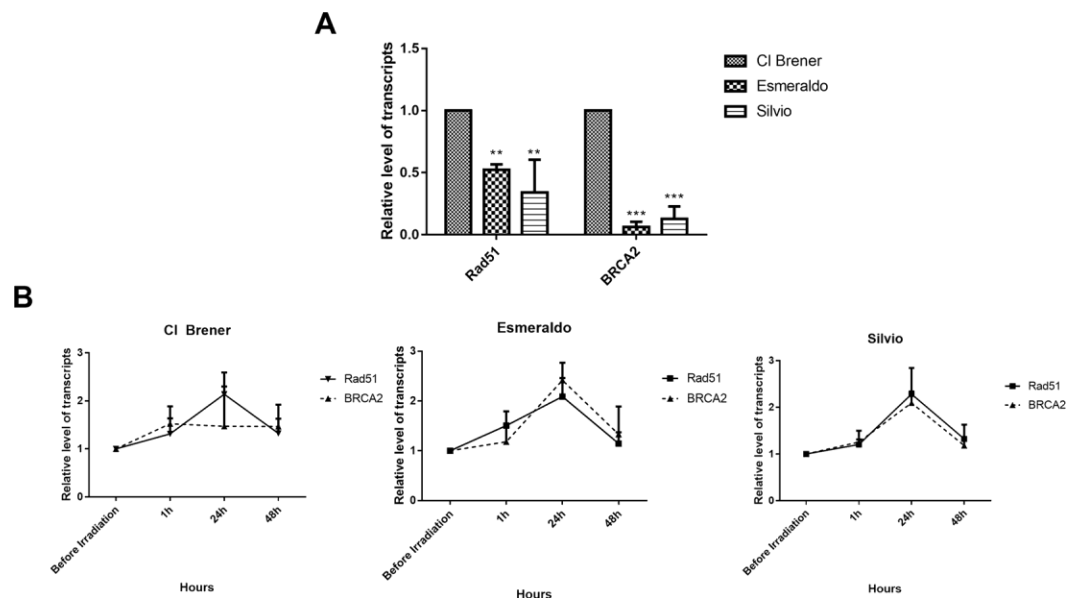


Figure 2. Naturally-occurring *T. cruzi* hybrids present increased levels of RAD51 and BRCA2 transcripts. (A) Naturally-occurring non-hybrid Esmeraldo and Silvio strains exhibit lower basal levels of RAD51 and BRCA2 transcripts when compared to CL Brener strain. (B) After irradiation, levels of RAD51 and BRCA2 transcripts increased in all strains. Transcription of RAD51 and BRCA2 present highest levels at 24h. The comparison was made with the respective non-irradiated strain at each time analyzed. Experiments were performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. _ (One-way ANOVA).

The fact that hybrid strains epimastigotes, after exposure to ionizing radiation, resumed their cellular growth earlier than all naturally-occurring non-hybrid strains tested (Fig. 1; S1 Fig.) suggests that naturally-occurring hybrids present a more efficient repair mechanism of DSBs. We then hypothesized that genes involved in DSB repair pathway could be differentially transcribed in all *T. cruzi* strains previously examined. In order to test this hypothesis, we determined the levels of RAD51 and BRCA2 transcripts in epimastigotes through real-time quantitative PCR, using specific primers to each gene. As shown in Fig. 2A, transcriptional levels of RAD51 and BRCA2 are higher in the CL Brener strain; in fact, the shorter cellular arrest exhibited by this naturally-hybrid strain may be associated to the increased basal levels of both Rad51 and Brca2 as Esmeraldo and Silvio strains – which display lower transcriptional levels of RAD51 and BRCA2 when compared to CL Brener – also exhibited the same patterns of induction of transcription for these two genes after ionizing radiation treatment (Fig. 2B). Nonetheless, Silvio and Esmeraldo epimastigotes showed lower absolute levels of both RAD51 and BRCA2 transcripts when compared to CL Brener cells, in all time points analyzed, regardless if ionizing radiation treatment was conducted or not (Fig. 2).

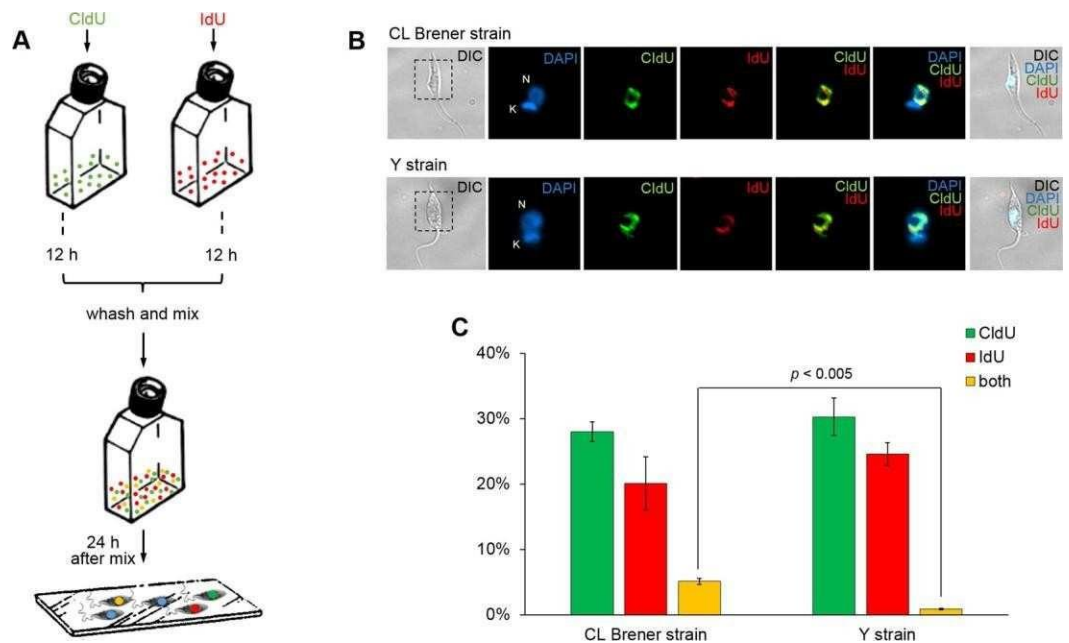


Figure 3. Increased co-detection of thymidine analogues in naturally-occurring *T. cruzi* hybrids shows increased rates of genetic exchange and formation of fused-cell hybrids. (A) Schematic diagram representing thymidine analogues incorporation assay. Thymidine analogues (CldU and IdU) were separately incubated in each culture for 12 h. After that, cells of *T. cruzi* clones CL Brener and Y were washed and pooled together, remaining mixed for 24 h. Samples were then added onto slides, and the process for analogues detection (using α -CldU/ α -IdU, and corresponding secondary antibodies) was performed. (B) Representative images were organized in seven columns: DIC (differential interference contrast), depicting morphology; DAPI, depicting staining nucleus (N) and kinetoplast (K); CldU, depicting CldU incorporation; IdU, depicting IdU incorporation; and CldU/IdU, DAPI/CldU/IdU, and DIC/DAPI/CldU/IdU depicting CldU/IdU, DAPI/CldU/IdU and DIC + DAPI + CldU + IdU overlays, respectively. All images represent fused-cell hybrids from clones CL Brener and Y. Images were analyzed using Olympus BX51 fluorescence microscope, and captured randomly to avoid bias. (C) Percentage of *T. cruzi* cells labeled with CldU (green), IdU (red), or with both analogues (yellow). The total of 233.6 ± 16.7 and 267 ± 6 cells of CL Brener and Y, respectively, were analyzed. Experiments were carried out in triplicate, and error bars indicate standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

Increased co-detection of halogenated thymidine analogues in naturally-occurring *T. cruzi* hybrids showed increased rates of genetic exchange and formation of fused-cell hybrids. In order to experimentally check, under laboratory conditions, the possibility of assessing the rates of genetic exchange in *T. cruzi* cells, we developed an experimental assay based on cellular incorporation of two distinguishable halogenated thymidine analogues, namely 5'-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) and 5'-iodo-2'-deoxyuridine (IdU), whose presence in the genetic material can be detected by immunostaining through the use of specific antibodies that generate distinct signals – red for CldU, and green for IdU – in labeled cells. As described in *Materials and methods*, and represented in Fig. 1A, either CldU or IdU was separately added to cultures of epimastigotes from two *T. cruzi* strains elected for this assay – naturally-occurring hybrid CL Brener strain (TcVI), and naturally-occurring non-hybrid Y strain (TcII)⁸. After 12 h in the presence of either CldU or IdU, *T. cruzi* cells were then washed thoroughly to eliminate the residual content of unincorporated halogenated thymidine analogues. Then, both CldU- and IdU-labeled cells from the same strain were co-incubated in the same culture flask, remaining together for the following 24 h (Fig. 3A). Based on the fact that CldU- and IdU-labeled cultures would not be able to incorporate the analogue they were not previously incubated with, simultaneous detection of both halogenated thymidine analogues in a given cell would be a result of genetic exchange and formation of fused-cell hybrids. Interestingly, after 24 h of co-incubation of CldU- and IdU-labeled cells, cultures from both *T. cruzi* clones – CL Brener and Y – exhibited epimastigotes harboring nuclear co-localization of the two thymidine analogues (Fig. 3B), showing the suitability of this experimental approach to determine genetic exchange in this parasite. Possible cross-reactions between the antibodies used in this assay – α -CldU and α -IdU primary antibodies, and Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 555 secondary antibodies – were ruled out as immunostaining using α -CldU against IdU-labeled parasites, and α -IdU against CldU-labeled ones, showed no presence of any detectable signals (S2 Fig.). The observed average percentage of epimastigotes co-localizing CldU and IdU in relation to the total cellular population, from three independent experiments, was 5.1% in CL Brener strain, and 0.85% in Y strain (Fig. 3C). The difference between those averages was statistically significant ($p < 0.005$, Student's *t* test), confirming the hypothesis that genetic exchange rates in *T. cruzi* clone CL Brener, a naturally-occurring hybrid strain, are significantly higher than those observed in *T. cruzi* clone Y, a naturally-occurring non-hybrid strain. Also, to rule out the possibility that the double-labeled cells were an artifact due to insufficient washing

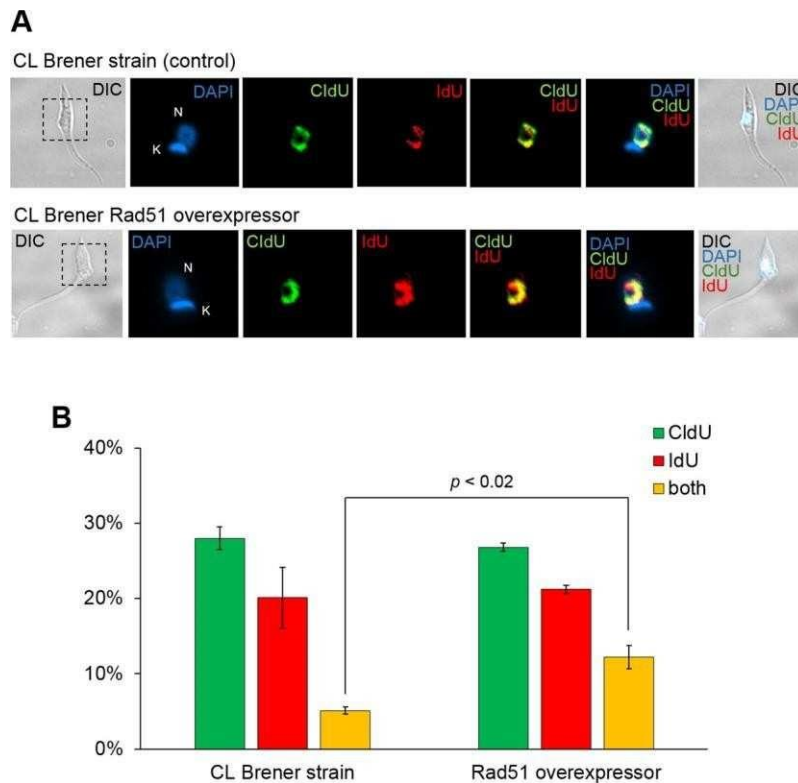


Figure 4. Overexpression of RAD51 increases the detection of *T. cruzi* fused-cell hybrids. (A) Representative images were organized in seven columns: DIC (differential interference contrast), depicting morphology; DAPI, depicting staining nucleus (N) and kinetoplast (K); CldU, depicting CldU incorporation; IdU, depicting IdU incorporation; and CldU/IdU, DAPI/CldU/IdU, and DIC/DAPI/CldU/IdU depicting CldU/IdU, DAPI/CldU/IdU and DIC+DAPI+CldU+IdU overlays, respectively. All images represent fused-cell hybrids from clones CL Brener and Y. Images were analyzed using Olympus BX51 fluorescence microscope, and captured randomly to avoid bias. (B) Percentage of *T. cruzi* cells labeled with CldU (green), IdU (red), or with both analogues (yellow). The total of 233.6 ± 16.7 and 231 ± 23.5 cells of CL Brener and Y, respectively, were analyzed. Experiments were carried out in triplicate, and error bars indicate standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

prior mixing, cells were washed extensively on high volumes of PBS. No significant alterations were observed on the percentage of double-stained cells (Fig. S2).

Overexpression of RAD51 increases the detection of *T. cruzi* fused-cell hybrids. Aiming to investigate if the increased rates of genetic exchange observed in CL Brener strain (Fig. 3) were related to increased levels of RAD51 and BRCA2 transcription levels (Fig. 2), we sought to investigate whether components from the recombination machinery could exert a direct effect on the detection of *T. cruzi* fused-cell hybrids. For such, we decided to construct a *T. cruzi* clone of CL Brener overexpressing RAD51, a key component of the recombination machinery³⁷. Making use of the thymidine incorporation assay previously described (Fig. 3), we determined the percentage of wild-type and RAD51-overexpressing *T. cruzi* clone CL Brener epimastigotes showing nuclear co-localization of both thymidine analogues (Fig. 4). After three independent assays, we found that the percentage of fused-cell hybrids generated by overexpression of RAD51 was 12.2%, compared to 5.1% in wild-type epimastigotes (Fig. 4B). The difference between those averages was statistically significant ($p < 0.02$, Student's *t* test), and shows that genetic exchange rates in *T. cruzi* epimastigotes overexpressing RAD51 are higher than in control cells; in fact, RAD51-overexpressing cells exhibit a more evident co-localization of both analogues (Fig. 4A). Taken together, these results suggest an important involvement of Rad51 in genetic exchange process in *T. cruzi*, either in the formation of fused-cell hybrids, or in the stabilization of them.

Axenic culture is capable of generating *T. cruzi* fused-cell hybrids. In order to further characterize the generation of fused-cell hybrids and the importance of Rad51 towards genetic exchange in *T. cruzi*, we decided to verify whether fused-cell hybrids could be recovered from (i) an axenic culture, (ii) a mammalian cell culture, and (iii) triatomine bugs, as described in *Materials and methods*. While no resistant parasites against hygromycin B and neomycin were recovered from the passages conducted either in mammalian cell cultures or in triatomine bugs, the solely axenic *T. cruzi* epimastigote cultures allowed us to recover two populations of fused-cell hybrids simultaneously carrying resistance genes to both antibiotics (Fig. 5). Two different clones were obtained from each of the two populations of fused-cell hybrids, and, through PCR, we verified that the isolated

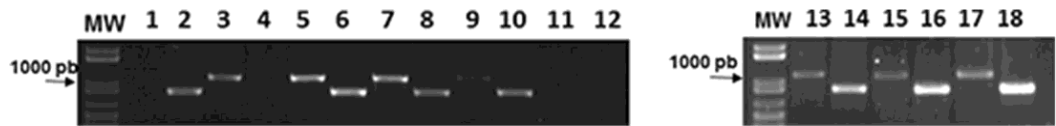


Figure 5. Axenic culture is capable of generating *T. cruzi* fused-cell hybrids. Fused-cell hybrids isolated from axenic cultures exhibited hygromycin B and neomycin genes amplified after genomic DNA extraction and PCR. Parental cells showed only one gene being amplified. The figure represents two separated runs in different gels. MW: 1 Kb Plus DNA Ladder; 1: pRock-neoDNA + hygromycin B primers; 2: pRock-neoDNA + primer neomycin primers; 3: pRock + RAD51-hygromycin B DNA + hygromycin primers; 4: pRock + RAD51-hygromycin B + neomycin primers; 5: clone #1 DNA + hygromycin B primers; 6: clone #1 DNA + neomycin primers; 7: clone #2 DNA + hygromycin B primers; 8: clone #2 DNA + neomycin primers; 9: clone #3 DNA + hygromycin B primers; 10: clone #3 DNA + neomycin primers; 11: negative control (DNA absent) + hygromycin B primers; 12: negative control (DNA absent) + neomycin primers; 13: clone #4 DNA + hygromycin B primers; 14: clone #4 DNA + neomycin primers; 15: population #1 DNA + hygromycin B primers; 16: population #1 DNA + neomycin primers; 17: population #2 DNA + hygromycin B primers; 18: population #2 + neomycin primers.

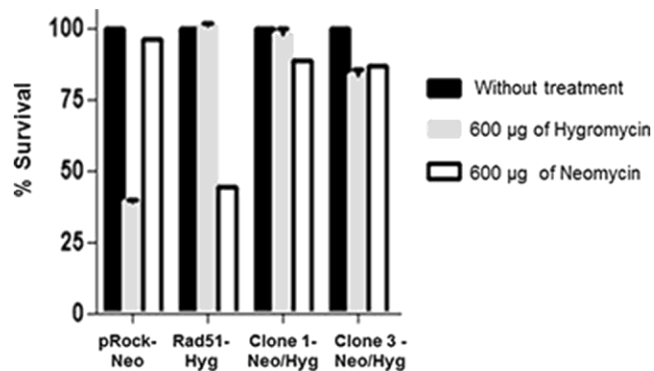


Figure 6. *T. cruzi* fused-cell hybrids present increased survival rate after co-treatment with hygromycin B or neomycin. Fused-cell hybrid survival rates were assessed 72 h after treatment with hygromycin B and/or neomycin. Fused-cell hybrids are resistant to both hygromycin B and neomycin, and parental cells (harboring only hygromycin B or neomycin resistant genes) showed marked sensitivity when co-incubated with both antibiotics.

clones (clones #1 to #4 of the first gel) – resistant to both antibiotics – indeed co-exhibited the hygromycin B and neomycin genes (Fig. 5). It is important to stress that no fused-cell hybrids were obtained from experiments performed with a pool of *T. cruzi* cells with either pROCK NEO or pROCK HYG. We also decided to assess the survival rate of two clones (#1 and #3) 72 h after treatment with 600 µg/mL hygromycin B and/or 600 µg/mL neomycin, and verified that both clones showed resistance against concentrations three-fold higher than usual for both antibiotics, while the two parental cells – those harboring either only RAD51 and hygromycin-resistant genes, or only the neomycin-resistant one – were sensitive to treatment with the antibiotics (Fig. 6).

Fused-cell hybrids present increased ploidy, impaired growth, but improved response against ionizing radiation. Fused-cell hybrids from *T. cruzi* were further characterized through the determination of their ploidy by flow cytometry, using the fluorescent DNA binding dye propidium iodide. While flow cytometry analysis showed that total DNA content does not vary between untransfected epimastigotes and epimastigotes overexpressing RAD51, the ploidy of fused-cell hybrids is evidently increased (Fig. 7). In addition, fused-cell hybrids (clones #1 to #5) showed decreased growth rates in comparison to the untransfected CL Brener epimastigote (Fig. 8).

As previously presented, after being exposed to moderate doses of ionizing radiation, *T. cruzi* epimastigotes exhibit a lag phase, and resume their cellular growth several days after irradiation, being this lag phase shorter when parasites are naturally-occurring hybrids (Fig. 2A)^{34–36}. We then finally investigated if fused-cell hybrids would be able to resume their cellular growth, after exposure to ionizing radiation, earlier than non-fused cells. Interestingly, after being treated with the dose of 500 Gy, fused-cell hybrids present decreased cellular growth arrest. These cells were able to resume cellular growth earlier than non-fused cells, and as fast as RAD51-overexpressing cells (Fig. 8).

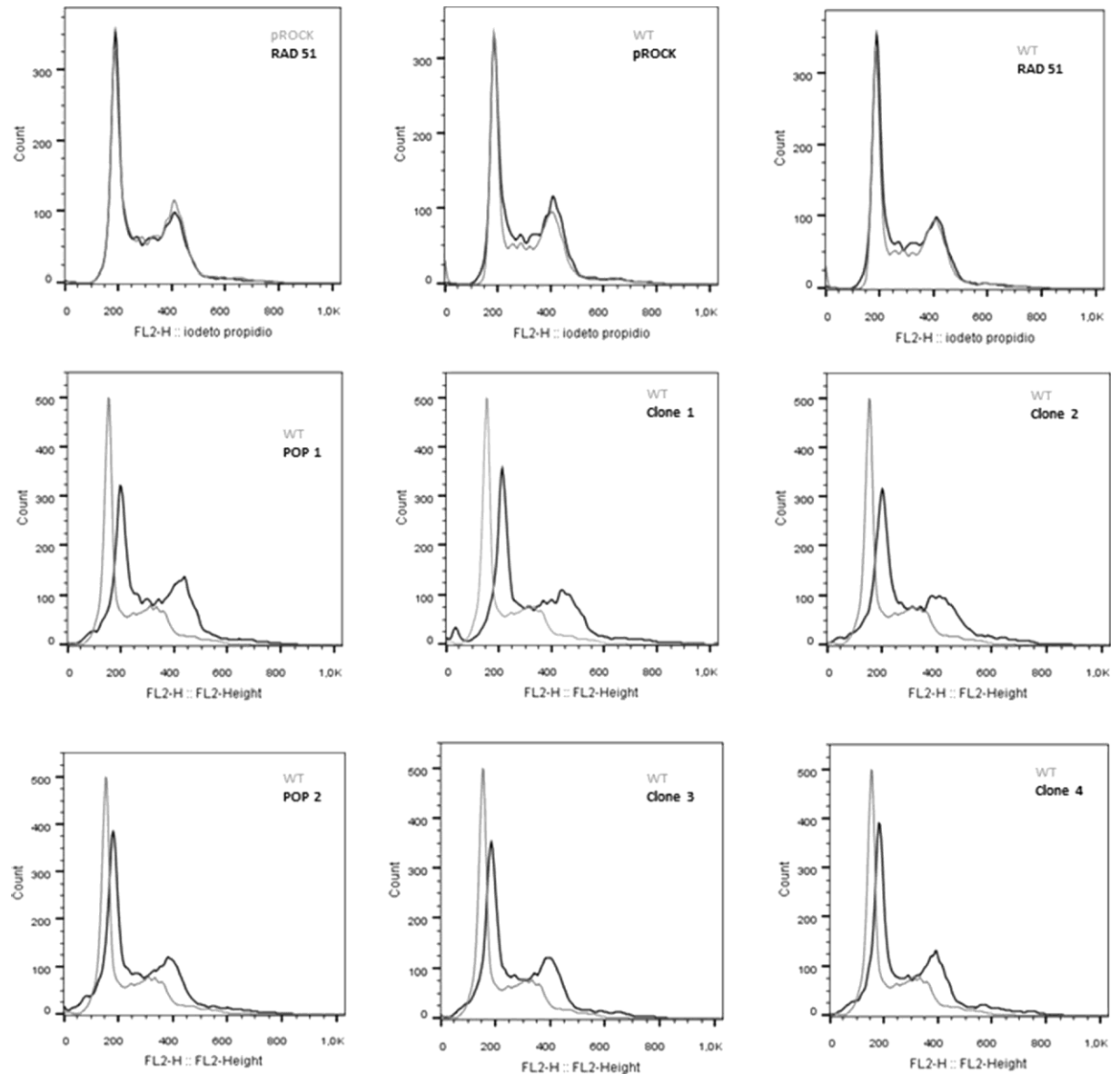


Figure 7. Fused cell hybrids present increased ploidy. Overlaid histograms show that the content of DNA from *T. cruzi* fused-hybrid cells is increased. pRock + RAD51: parental cells; POP: population; WT: wild-type; pRock: cells carrying pRock empty vector; RAD51: RAD51-overexpressing cell.

Discussion

Reproductive mechanisms of the trypanosomatid *T. cruzi* have been subject of intense discordance^{4,5}. Although it is accepted that genetic recombination possibly played a role at an evolutionary scale, the idea that this parasite undergoes hybridization to a relevant extent, at a generational scale, is still under some disbelief^{39,40}. Interestingly, the fact that *T. cruzi* clone CL Brener presents a proficient mechanism of DNA DSBs repairs suggests that this strain is undoubtedly prone to efficiently perform HR^{34–36,41,42}. Since HR has been described as an important factor to generate genetic exchange and promote environmental fitness in all domains of life^{43–48}, we then hypothesized that *T. cruzi* CL Brener harbors a strong prerogative which qualifies it as a potential subject of genetic exchange.

In fact, when compared to naturally-occurring non-hybrid strains, naturally-occurring hybrid epimastigotes present decreased cellular growth arrest after exposure to gamma radiation (Figs 1 and S1). CL Brener strain presents higher levels of RAD51 and BRCA2 transcripts (Fig. 2). Brca2 is a protein involved in Rad51 loading into the broken DNA site in order to promote the formation of the nucleoprotein filament required to HR^{37,49,50}. Rad51 is responsible for strand invasion and search of homology between the broken strand and the template^{37,51}. Also, it has already been demonstrated that particular variations in HR can arise from alterations in Rad51 and Brca2 activities^{52,53}. RAD51-silenced *Trypanosoma brucei* exhibits defective variant surface glycoprotein (VSG) switching and increased tendency to the generation of DSBs⁵⁴; these phenotypes are also observed in *T. brucei*

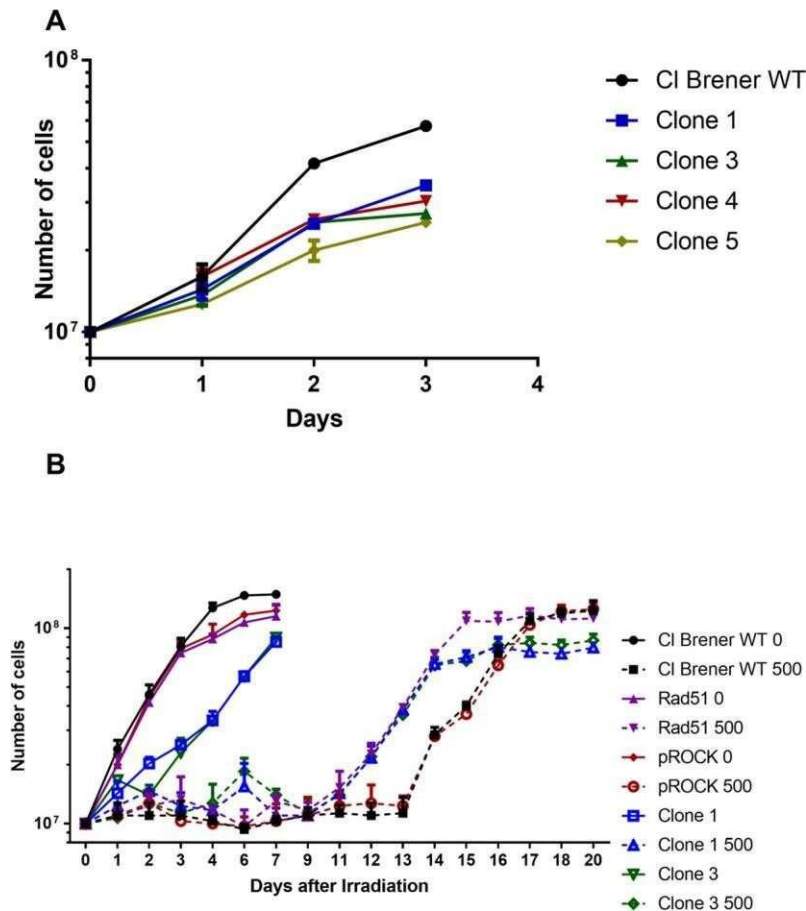


Figure 8. Fused cell hybrids present impaired growth, but decreased cellular growth arrest in response to ionizing irradiation. (A) CL Brener Fused-cell hybrids (clones #1 to #5) show decreased growth when compared to non-fused cells (WT). (B) Fused-cell hybrids (clones #1 and #3) present decreased cellular growth arrest after exposed to 500 Gy of ionizing irradiation.

strains carrying mutations that reduce the number of BRC repeats in BRCA2⁵⁵. Although RNA abundance is not generally indicative of protein levels in *T. cruzi*, the faster recovery shown by CL Brener – a naturally-occurring hybrid strain – to resume its cellular growth when compared to naturally-occurring non-hybrid strains (Fig. 1; S1 Fig.) may be related with the difference of RAD51 and BRCA2 transcriptional levels (Fig. 2) since the interaction of Rad51 with Brca2 is essential to an efficient cellular response to DSBs generation^{41,56}.

We next developed an assay based on thymidine analogues incorporation, aiming to detect possible *T. cruzi* fused-cell hybrids through immunostaining. Interestingly, we were not only able to detect cells that underwent genetic exchange in *T. cruzi* clones CL Brener and Y, but also to quantitate the percentage of the sub-population that has been subject to this process (Fig. 3). Remarkably, the naturally-occurring hybrid CL Brener strain shows a significant increase in the percentage of epimastigotes that went through genetic exchange ($5.1\% \pm 0.47$) when compared to the naturally-occurring non-hybrid strain Y ($0.85\% \pm 0.13$). This result suggested that (i) genetic exchange in *T. cruzi* may be more pervasive than initially believed, and that (ii) there is a correlation between the rates of genetic exchange detection and the expression levels of RAD51 and BRCA2. We then sought to use a *T. cruzi* clone CL Brener overexpressing RAD51 in an attempt to verify whether a further increase in Rad51 levels could further increase the frequency of detection of genetic exchange in this parasite. Surprisingly, the detection of fused-cell hybrids in CL Brener epimastigotes overexpressing RAD51 exhibited significant increase in relation to wild-type CL Brener epimastigotes (Fig. 4), showing that Rad51 plays an important role in events of genetic exchange in *T. cruzi*, either in the generation or in the stabilization of fused-cell hybrids.

In order to further characterize the process of formation and isolation of fused-cell hybrids, we next determined whether fused-cell hybrids could be obtained from axenic cultures, mammalian cells or triatomine bugs. Contrarily to Gaunt *et al.*, who obtained fused-cell hybrids after passage in mammalian cells¹², we were able to recover fused-cell hybrids solely from axenic cultures (Figs 5 and 6). We hypothesize that in the work from Gaunt *et al.* genetic exchange may have been allowed to occur during the conversion of epimastigotes into trypomastigotes in axenic cultures, being the passage in mammalian cells a selective pressure for isolation of fused-cell hybrids. Also, noteworthy is the fact that other trypanosomatids, namely *Leishmania spp.* – which present natural hybrids^{57,58} –, and *T. brucei* – which is able to form haploid gametes¹⁶ –, exhibit a sexual cycle in the insect vector, suggesting that, in nature, this is the environment in which genetic exchange takes place^{15,16,59–62}. We further

hypothesize that our group was not able to detect fused-cell hybrids in the triatomine bug as the total period of passage in the insect vector – 30 d – was not long enough to allow genetic exchange, or stabilization of fused-cell hybrids. Finally, as expected, fused-cell hybrids from axenic cultures showed predicted inheritance of traits from parental cells once they present co-resistance against hygromycin B and neomycin (Fig. 6).

Ploidy of fused-cell hybrids generated from CL Brener epimastigotes overexpressing RAD51 – in which HR is increased – was also evaluated, showing that, although not being tetraploid, fused-cell hybrids undoubtedly presented higher DNA content than wild-type cells (Fig. 7). Interestingly, Lewis *et al.* demonstrated that prolonged maintenance of fused-cell hybrids in axenic cultures leads to a gradual and continuous DNA erosion⁶³. In fact, since RAD51-overexpressing fused-cell hybrids clones exhibit decreased cellular growth arrest after being irradiated (Fig. 8B), we can suggest that overexpression of RAD51 in *T. cruzi* promotes a more efficient HR, process by which DNA content of fused-cell hybrids can be reduced, promoting genomic stabilization. However, it is expected that other factors also play a role in stabilization of fused-cell hybrids given their decreased growth rate and lower biomass formation (Fig. 8A).

HR is one major source of variability in unicellular organisms, allowing them to acquire beneficial characteristics which can be exploited to promote increased cellular adaptation and survival⁶⁴. In fact, the HR pathway is shown to be activated by the absence of mismatch DNA repair in *Escherichia coli*⁴⁷, and is directly linked to VSG switch in *T. brucei*^{55,65}. This suggests that the genetic exchange in naturally-occurring hybrid *T. cruzi* strains is dependent on an efficient mechanism of HR which allows the stabilization of parasexually-originated tetraploid cells⁶⁴; this could explain why it is difficult to detect natural hybrids from naturally-occurring non-hybrid strains. Despite the fact that *T. cruzi* harbors the DNA meiotic recombinase DMC1 – which potentially allows this parasite to produce gametes and perform sexual genetic exchange^{66,67} –, all evidence available so far suggests that *T. cruzi* hybrids are formed by the fusion of individuals which present an increased deficiency to perform HR, thus characterizing parasexual reproduction, a process independent of meiosis²⁸. This hybridization can be observed at a generational scale, and it is able to generate tetraploid cells, whose ploidy will decrease through HR, granting the fused-cell hybrids genomic stability and genetic variability.

Methods

Cellular strains and culture. Epimastigotes of *T. cruzi* clones CL Brener, Esmeraldo, Sylvio, Dm28c, Y – all strains provided by Dr. Egler Chiari, Universidade Federal de Minas Gerais – and Bug2149 cl10 – a strain kindly provided by Dr. Bianca Zingales, Universidade de São Paulo, Brazil – were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% complement-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco), 200 units/mL penicillin, and 200 µg/L streptomycin sulfate, at 28 °C. Epimastigotes transfected with the integrative vector pROCK_hygroB overexpressing RAD51 were previously obtained³⁵, and those harboring the integrative vector pROCK_neo and pROCK_hygroB were transfected according to DaRocha *et al.*⁶⁸. Transfected parasites were cultured in LIT medium supplemented with 200 µg/mL hygromycin or neomycin. Rhesus monkey kidney (LLC-MK2) cells⁶⁹ monolayers were cultured in 2% FBS, 1% penicillin-streptomycin, and 2 mM glutamine supplemented Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Aldrich), and were infected using axenic *T. cruzi* cultures at stationary phase containing both the epimastigotes and metacyclic trypomastigotes. Once the infection was successfully established, trypomastigotes were maintained in LLC-MK2 monolayers and purified by pellet incubation for 2 h at 37 °C, followed by harvest of motile infective cells in the supernatant.

***T. cruzi* irradiation and cellular growth curve.** In order to determine *T. cruzi* response to DSBs generated by ionizing radiation, 5 mL of cellular cultures containing 1.10⁷ parasites/mL were exposed to gamma radiation for 20 min, under a rate of irradiation of 1500 Gy/h using a⁶⁰Co irradiator, to a total dose of 500 Gy. Cell counting was performed using a Neubauer chamber using erythrosine as vital dye to differentiate live from dead cells. Gamma-irradiated cultures had their cells counted until they reach the stationary growth phase. Experiments were performed in triplicate.

RNA extraction from *T. cruzi* and real-time quantitative PCR. RNA from *T. cruzi* was purified using the TRIzol Reagent (Invitrogen). Treatment with TURBO DNA-Free Kit (Ambion, Thermo Fisher) was conducted according to manufacturer's protocol to remove contaminant DNA. PCRs with total RNA were performed with qPCR primers to verify the persistence of any DNA contaminant. A number of 10⁸ parasites were used for RNA extraction at time points 0, 24, and 48 h after exposure to 500 Gy of ionizing radiation – naturally, control cells were not irradiated. The mass of 1 µg of purified RNA was used to cDNA synthesis in a reaction using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), according to manufacturer's protocol. A reaction with no transcriptase was performed as negative control. Relative quantification of transcripts was performed by the use of specific primers which hybridizes to specific regions of BRCA2 and RAD51 (Table S1). Reactions were conducted in the presence of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) using glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) as a control gene. For each reaction were used 20 µL of reaction mix, 200 nM of primers, 5 µL of SYBR Green Master Mix 2×, and DNase/RNase free water to 10 µL. Reactions were performed in a 384-well plate. All determinations were performed in triplicate. The relative amount of RAD51 transcripts was calculated by the 2^{-ΔΔCt} method.

Genetic exchange determination in *T. cruzi*. Exponential cultures (~1.10⁷ parasites/mL) of *T. cruzi* were divided in two tissue culture flasks and, each one was labeled with thymidine analogues CldU and IdU 100 µM (Sigma) for 12 h, at 28 °C. Cells were then collected by centrifugation (1500 × g, 5 min) and washed 3 times using fresh LIT medium to remove unincorporated thymidine analogues. Parasites were then mixed and incubated for 24 h, at 28 °C, to allow cells undergo genetic exchange. CldU- and/or IdU-labeled cells were washed with 1× PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4), and fixed in 4% (v/v)

paraformaldehyde in 1X PBS, for 10 min, at room temperature. Cells were then deposited on poly-L-lysine coated slides, and permeabilized with 0.1% Triton-X 100 in 1X PBS, for 10 min. Fixed parasites were next washed 3 times with 1X PBS, and treated with 2.5 M HCl, for 20 min, at room temperature, to increase antibody's accessibility to incorporated thymidine analogues. After that, cells were incubated for 2 h, at room temperature, with rat anti-CldU monoclonal antibody (Accurate), and mouse anti-IdU monoclonal antibody (BD), both diluted 1:300 in blocking solution [4% (w/v) bovine serum albumin diluted in 1X PBS]. Slides were then washed with 1X PBS, and incubated for 2 h, at RT, with secondary antibodies Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse (Thermo Scientific), and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat (Thermo Scientific), being further washed three times using 1X PBS and VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Labs) was used as the anti-fade mounting solution, and also to stain nuclear and kinetoplast DNA. Images were captured using Olympus BX51 fluorescence microscope and Olympus XM10 digital camera. Images were analyzed using Olympus Cell software (version 5.1.2640).

Selection of *T. cruzi* harboring co-resistance against hygromycin B and neomycin. *T. cruzi* axenic culture was conducted by pooling together, in the same culture flask, a population of CL Brener epimastigotes carrying a vector co-harboring RAD51 and the hygromycin B resistance gene with another population of CL Brener epimastigotes harboring an empty vector carrying the neomycin resistance gene – a flask containing a pool of a population of *T. cruzi* transfected with an empty vector carrying the neomycin resistance gene and another population of *T. cruzi* transfected with an empty vector carrying the hygromycin B resistance gene was used as control. After 21 d of incubation in LIT, this pool of mixed cells was then passaged to LIT supplemented with both hygromycin B and neomycin, and cultured for 60 d in order to select fused-cell hybrids which were resistant to both antibiotics. Rhesus monkey kidney (LLC-MK2)⁶⁹ cells were infected with the same pools of cultures aforementioned described. Aliquots from the supernatant were periodically collected between days 14 and 21, and parasites were then cultured in axenic cultures with LIT supplemented with both hygromycin B and neomycin. Third instar nymphs of *Rhodnius prolixus* were reinfected with the two previously mentioned pools of populations of CL Brener epimastigotes through artificial feeding. Thirty days after infection, insects were dissected, parasites were isolated, and next cultured in axenic cultures carried out in LIT supplemented with both hygromycin B and neomycin. *T. cruzi* cells showing co-resistance against both hygromycin B and neomycin were plated onto solid blood agar plates supplemented these two antibiotics. After 6 weeks, isolated colonies were recovered from the plates, and inoculated into LIT supplemented with hygromycin B and neomycin.

***T. cruzi* genomic DNA extraction.** *T. cruzi* genomic DNA was extracted through cellular lysis, deproteinization and precipitation, as described in Andrade *et al.*, 1999⁷⁰. Briefly, a defined number of exponentially-grown *T. cruzi* cells (1×10^8) were washed three times with PBS, and incubated in 200 μ L of lysis solution [(0.5% SDS, 100 μ M EDTA, and 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)] with 20 μ g/mL RNase, for 1 h, at 37°C. Then, 100 μ g/mL proteinase K was added to the lysate, which was incubated at 50°C for 3 h. Deproteinization was conducted by the addition of 200 μ L saturated phenol followed by gently homogenization, centrifugation, and dispose of the organic phase – the same procedure was repeated for the addition of 200 μ L of phenol/chloroform 1:1 (v/v), and 200 μ L of chloroform. DNA precipitation was carried out using absolute isopropanol at –80°C overnight. This isopropanolic suspension of DNA was then centrifuged at 16,000 \times g, for 10 min, and pelleted DNA was washed twice with ethanol 70% before being dry and resuspended in sterile MilliQ water.

Determination of survival rates after co-treatment with hygromycin B and neomycin. Survival rates of *T. cruzi* treated with 600 μ g/mL hygromycin and/or neomycin were assessed 72 h after antibiotic treatment in LIT medium. The number of live and dead parasites was determined using a Neubauer using erythrosine as vital dye as described previously. All experiments were performed in triplicate.

Determination of DNA content in *T. cruzi*. The number of 1.10^7 *T. cruzi* cells at exponential growth phase was collected by centrifugation at 900 \times g, for 10 min. The supernatant was discarded, and the cellular pellet was washed once in 1X PBS, centrifuged again, being the pellet re-suspended in 70% (v/v) ethanol. After overnight incubation, fixed cells were centrifuged at 900 \times g, for 10 min, and the supernatant was discarded. The cellular pellet was then washed in PBS, and cells were finally re-suspended in PBS solution containing propidium iodide and RNase A in final concentrations of 10 μ g/mL. Next, samples were incubated for 30 min, at 37°C, protected from light, and their DNA content was measured by FACScan flow cytometer (BD), and analyzed using FlowJo software.

References

1. Organization, W.H. Media Center: Chagas disease (American trypanosomiasis). (2014). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#> (Accessed: 25th August 2014).
2. Jimenez, V. Dealing with environmental challenges: Mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Res. Microbiol.* **165**, 155–165 (2014).
3. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases* **1**, 92–100 (2001).
4. Messenger, L. A. & Miles, M. A. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **151**, 150–155 (2015).
5. Ramirez, J. D. & Llewellyn, M. S. Reproductive clonality in protozoan pathogens—truth or artefact? *Mol. Ecol.* **23**, 4195–4202 (2014).
6. Andrade, L. O., Machado, C. R. S., Chiari, E., Pena, S. D. J. & Macedo, A. M. *Trypanosoma cruzi*: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.* **100**, 269–275 (2002).
7. Marçili, A. *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome band Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* **136**, 641–655 (2009).
8. Zingales, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 240–53 (2012).

9. Baptista, R. *et al.* Evidence of substantial recombination among Trypanosoma cruzi strains from Minas Gerais. *Infect. Genet. Evol.* **22**, 183–91 (2014).
10. De Freitas, J. M. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of Trypanosoma cruzi. *PLoS Pathog.* **2**, 0226–0235 (2006).
11. Higuera, S. L., Guhl, F. & Ramírez, J. Identification of Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit. Vectors* **6**, 112 (2013).
12. Gaunt, M. W. *et al.* Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* **421**, 936–939 (2003).
13. Machado, C. A. & Ayala, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of Trypanosoma cruzi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7396–401 (2001).
14. Sturm, N. R., Vargas, N. S., Westenberger, S. J., Zingales, B. & Campbell, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in Trypanosoma cruzi. *Int. J. Parasitol.* **33**, 269–279 (2003).
15. Akopyants, N. S. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. *Science* **324**, 265–8 (2009).
16. Peacock, L., Bailey, M., Carrington, M. & Gibson, W. Meiosis and haploid gametes in the pathogen Trypanosoma brucei. *Curr. Biol.* **24**, 181–186 (2014).
17. Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. Reproductive clonality of pathogens: A perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E3305–E3313 (2012).
18. Brisse, S. *et al.* Evidence for genetic exchange and hybridization in Trypanosoma cruzi based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* **2**, 173–83 (2003).
19. Fernandes, O. *et al.* Populational heterogeneity of Brazilian Trypanosoma cruzi isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**(Suppl 1), 195–197 (1999).
20. Brisse, S., Barnabé, C. & Tibayrenc, M. Identification of six Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* **30**, 35–44 (2000).
21. Buscaglia, Ca & DiNoia, J. M. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* **5**, 419–427 (2003).
22. Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. Trypanosoma cruzi and the model of predominant clonal evolution. *Am. Trypanos. Chagas Dis. One Hundred Years Res. Second Ed.* 475–495 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00021-6> (2017).
23. Flores-López, Ca & Machado, Ca Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among Trypanosoma cruzi lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1272 (2011).
24. Llewellyn, M. S. *et al.* Trypanosoma cruzi IIc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000510> (2009).
25. Llewellyn, M. S. *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of Trypanosoma cruzi discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410> (2009).
26. Ocana-Mayorga, S., Llewellyn, M. S., Costales, J. A., Miles, M. A. & Grijalva, M. J. Sex, subdivision, and domestic dispersal of Trypanosoma cruzi Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000915> (2010).
27. Sherwood, R. K. & Bennett, R. J. Fungal meiosis and parasexual reproduction - lessons from pathogenic yeast. *Current Opinion in Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.09.005> (2009).
28. Schwabl, P. *et al.* Parallel sexual and parasexual population genomic structure in Trypanosoma cruzi. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/338277> (2018).
29. Gyles, C. & Boerlin, P. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Vet. Pathol.* **51**, 328–340 (2014).
30. Davila, J. I. *et al.* Double-strand break repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in Arabidopsis. *BMC Biol.* **9**, 64 (2011).
31. Gibson, W. & Stevens, J. Genetic exchange in the trypanosomatidae. *Advances in Parasitology* **43** (1999).
32. Passos-Silva, D. G. *et al.* Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major. *J. Nucleic Acids* **2010**, 840768 (2010).
33. Riley, Pa Freeradicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 27–33 (1994).
34. Grynberg, P. *et al.* Trypanosoma cruzi gene expression in response to gamma radiation. *PLoS One* **7**, e29596 (2012).
35. Regis-da-Silva, C. G. *et al.* Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**, 191–200 (2006).
36. Vieira, H. G. S. *et al.* Proteomic Analysis of Trypanosoma cruzi Response to Ionizing Radiation Stress. *PLoS One* **9**, e97526 (2014).
37. Heyer, W. D. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. *Topics in Current Genetics* **17**, 251–283 (2007).
38. Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of Homologous Recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **244**, 113–139 (2010).
39. Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. The population genetics of Trypanosoma cruzi revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta Trop.* **151**, 156–165 (2015).
40. Tibayrenc, M. & Ayala, F. J. Is Predominant Clonal Evolution a Common Evolutionary Adaptation to Parasitism in Pathogenic Parasitic Protozoa, Fungi, Bacteria, and Viruses? *Adv. Parasitol.* **97**, 243–325 (2017).
41. Cerqueira, P. G. *et al.* Effect of ionizing radiation exposure on Trypanosoma cruzi Ubiquitin-Proteasome System. *Mol. Biochem. Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.01.005> (2017).
42. Chiurillo, M. A. *et al.* Subtelomeric I-SceI-Mediated Double-Strand Breaks Are Repaired by Homologous Recombination in Trypanosoma cruzi. *Front. Microbiol.* **7**, 2041 (2016).
43. Lieberman-Lazarovich, M. & Levy, A. A. Homologous Recombination in Plants: An Antireview BT - Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols. *in Plant Chromosome Engineering* 51–65 https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4_3 (2011).
44. Redfield, R. J. Do bacteria have sex? *Nat. Rev. Genet.* **2**, 634–639 (2001).
45. White, M. F. Homologous recombination in the archaea: the means justify the ends. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 15–19 (2011).
46. Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. & Jasin, M. Homologous Recombination and Human Health. *Perspect. Biol.* **1**–29 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600> (2015).
47. Taddei, F., Vulić, M., Radman, M. & Matic, I. Genetic variability and adaptation to stress. *In Environmental Stress, Adaptation and Evolution* (eds Bijlsma, R. & Loeschcke, V.) 271–290 (1997).
48. Vos, M. & Didelot, X. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J.* **3**, 199–208 (2008).
49. Davies, O. R. & Pellegrini, L. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 475–83 (2007).
50. Pellegrini, L. *et al.* Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**, 287–93 (2002).
51. Baumann, P. & West, S. C. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded break repair. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 247–251 (1998).
52. Brown, E. T. & Holt, J. T. Rad51 overexpression rescues radiation resistance in BRCA2-defective cancer cells. *Mol. Cell.* **48**, 105–109 (2009).
53. Yuan, S. S. F. *et al.* BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex *in vivo*. *Cancer Res.* **59**, 3547–3551 (1999).

54. McCulloch, R. & Barry, J. D. A role for RAD51 and homologous recombination in Trypanosoma brucei antigenic variation. *Genes Dev.* 13, 2875–2888 (1999).
55. 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. *Mol. Microbiol.* 68, 1237–51 (2008).
56. Magwood, A. C. *et al.* Endogenous levels of Rad51 and Brca2 are required for homologous recombination and regulated by homeostatic re-balancing. *DNA Repair (Amst)*. 12, 1122–1133 (2013).
57. Ravel, C. *et al.* First report of genetic hybrids between two very divergent Leishmania species: Leishmania infantum and Leishmania major. *Int. J. Parasitol.* 36, 1383–1388 (2006).
58. Nolder, D., Roncal, N., Davies, C. R., Llanos-Cuentas, A. & Miles, M. A. Multiple hybrid genotypes of Leishmania (Viannia) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 573–578 (2007).
59. Inbar, E. *et al.* The Mating Competence of Geographically Diverse Leishmania major Strains in Their Natural and Unnatural Sand Fly Vectors. *PLoS Genet.* 9 (2013).
60. Rougeron, V. *et al.* Reproductive strategies and population structure in Leishmania: Substantial amount of sex in Leishmania Viannia guyanensis. *Mol. Ecol.* 20, 3116–3127 (2011).
61. Duffy, C. W. *et al.* Population Genetics of Trypanosoma brucei rhodesiense: Clonality and Diversity within and between Foci. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013).
62. Jenni, L. *et al.* Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322, 173–5 (1986).
63. Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Yeo, M. & Miles, M. A. Experimental and Natural Recombination in Trypanosoma Cruzi. In *American Trypanosomiasis* 459–474 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00018-6> (2010).
64. Kelso, A. A., Waldvogel, S. M., Luthman, A. J. & Sehorn, M. G. Homologous recombination in protozoan parasites and recombination inhibitors. *Front. Microbiol.* 8 (2017).
65. Bell, J. S. & McCulloch, R. Mismatch Repair Regulates Homologous Recombination, but Has Little Influence on Antigenic Variation, in Trypanosoma brucei. *J. Biol. Chem.* 278, 45182–45188 (2003).
66. Heitman, J. Sexual Reproduction and the Evolution of Microbial Pathogens. *Current Biology* 16 (2006).
67. Bernstein, H. & Bernstein, C. Evolutionary Origin of Recombination during Meiosis. *Bioscience* 60, 498–505 (2010).
68. Da Rocha, W. D. *et al.* Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92, 113–20 (2004).
69. Hull, R. N., Cherry, W. R. & Tritch, O. J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2 (NCTC-3196) and their utility in virus research. *J. Exp. Med.* 115, 903–918 (1962).
70. Andrade, L. O., Machado, C. R. S., Chiari, E., Pena, S. D. J. & Macedo, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 163–172 (1999).

Acknowledgements

We would like to thank all the members from the laboratories involved in this work. We also thank the support of the funding agencies: CNPq-Brazil, PRONEX/FAPEMIG, Newton Fund/FAPEMIG, FAPEMIG and FAPESP (2014/24170-5; 2013/07467-1; 2016/50050-2).

Author Contributions

Conceptualization: C.R.M., G.R.F., M.C.E., E.B.T., A.A.G., L.O.A.; Formal Analysis: C.L.A., B.M.R., M.S.S.; Funding Acquisition: C.R.M., S.D.J.P., A.M.M., G.R.F., M.C.E.; Investigation: C.L.A., B.M.R., M.S.S., P.A.M., I.C.M., P.H.N.A., S.S.S.; Methodology: C.R.M., M.S.S., M.C.E.; Resources: C.R.M., S.D.J.P., A.M.M., G.R.F., L.O.A., M.C.E., A.A.G.; Visualization: C.L.A., B.M.R., M.S.S., E.B.T.; Writing – Original Draft Preparation: C.R.M., C.L.A., B.M.R., M.S.S., E.B.T.; Writing – Review & Editing: B.M.R., C.R.M., E.B.T., M.C.E., L.O.A., A.A.G.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31541-z>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018