

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Estudio de TvRAD51 en *Trichomonas vaginalis* durante el microambiente de la
tricomoniasis masculina**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA:

José Jesús Flores Vega

Directora: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Codirector: Dr. Jonathan Puente Rivera



**COLEGIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**

Ciudad de México, Noviembre, 2024.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
PLANTEL DEL VALLE

Integración del Jurado

Presidente:	Dr. José Alberto Mendoza Espinoza	Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Secretario:	Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez	Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Vocal:	Dr. Jonathan Puente Rivera	Hospital Juárez de México

Directora

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Codirector

Dr. Jonathan Puente Rivera
Hospital Juárez de México

Agradecimientos

A través de las siguientes palabras quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron con el soporte científico y humano para la elaboración de este trabajo de investigación. Quiero agradecer este trabajo a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por darme las herramientas para cumplir con este proyecto.

A la doctora María Elizabeth Álvarez Sánchez por permitirme y darme un espacio, apoyo y confianza para concluir este trabajo.

Al doctor Jonathan Puente Rivera por siempre darme apoyo y tenerme la paciencia necesaria para seguir adelante y nunca dejarme solo.

A la doctora Elisa Figueroa Angulo por apoyarme y darme consejos y confianza a lo largo de mi trabajo.

A mis lectores el Dr. José Olivares, Dr. Mauricio Castañón y al Dr. José Alberto.

Al doctor Alfonso por ayudarme y tener acceso a equipos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Quiero agradecer en particular a la maestra en Ciencias Laura Isabel Vázquez Carrillo por haberme instruido en el laboratorio y todo su apoyo. A la doctora Jacqueline Casteñeda Ortiz por su apoyo y consejos.

A mis compañeros Mtro. Yussel Fernando Pérez Navarro, Mtro. Marcos Morales y Mtro. José Alberto Santiago De la Cruz por su apoyo incondicional en este proyecto, tanto en partes experimentales como en aporte de conocimientos.

A mis mejores amigos, Daniel Bravata, Paulina Méndez y Yessica Pérez por siempre apoyarme en la carrera y ser un apoyo de todo tipo.

A todas las personas que trabajan en laboratorio 1 por todo en lo que me apoyaron en este proceso, Edgar, Adriana, Mariana, Gael, Ithan, Carlos, Laura, gracias por todo. Y a todos los amigos que realice en el posgrado, Kevin, Ángela, Danna, Marlene, Karina.

A todas las personas de coordinación, titulación y secretarías de ciencias genómicas que me ayudaron con todo el proceso para llevar a cabo este trabajo.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a todas las personas que tuvieron fe y creyeron en mí.

Este trabajo especialmente es dedicado a mi familia por todo el apoyo y sacrificio que hicieron para yo poder cumplir mi sueño, por todas las veces que no los pude acompañar o estar con ellos, este trabajo es para mi madre y padre que me dieron todas las herramientas para estar hoy en día aquí, este trabajo es poco de lo que les puedo dar como agradeciendo por todo lo que me han dado y enseñado. Para mis hermanos y los demás integrantes de mi familia que siempre me acompañan en mis sueños.

A mis amigos Daniel, Paulina y Yessica por acompañarme en todo lo bueno y apoyarme en todo lo malo los 4 años de carrera gracias por todo y este trabajo está dedicado a ustedes.

A mis amigos de posgrado que siempre estuvieron conmigo dándome apoyo, consejos y sobre todo hacer mis días de posgrado más agradables, Yussel, Edgar, Adriana, Kevin y Ángela que me ayudaron he impulsaron siempre. A mis compañeros de laboratorio 1 que me ayudaban y explicaban, gracias a Mariana, Gahel, Laura y Jacqueline.

Índice

1. Antecedentes generales	1
1.1 Tricomoniasis.....	1
1.2 Epidemiología	1
1.3 Diagnóstico	4
1.4 Tratamiento	4
2. Biología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	7
2.1 Características de <i>T. vaginalis</i>	7
2.2 Ciclo biológico del parásito <i>T. vaginalis</i>	10
2.3 Estructura genómica de <i>T. vaginalis</i>	11
2.4 Patogénesis de la tricomoniasis	12
2.4.1 Citoadherencia.....	12
2.4.2 Citotoxicidad.....	13
2.4.3 Fagocitosis	13
2.4.4 Hemólisis	13
2.4.5 Apoptosis.....	14
2.4.6 Evasión del sistema inmune	14
3. Iones metálicos en el tracto urogenital masculino.....	15
3.1 Hierro Fe ²⁺ en el tracto urogenital masculino.....	15
3.2 Magnesio (Mg ²⁺) y Manganeso (Mn) en el tracto urogenital masculino	16
3.3 Zinc (Zn ²⁺) en el tracto urogenital masculino	16
3.4 Cadmio (Cd ²⁺) en el tracto urogenital masculino	17
4. Daño al material genético	19
5. Recombinación homóloga.....	20
6. Recombinasa DMC1	22
7. Recombinasa RAD51.....	23
7.1 Mediadores y parálogos de RAD51	23
Antecedentes generales.....	25
Antecedentes particulares.....	27
Justificación	32
Hipótesis.....	33
Objetivo general	34
Objetivos específicos	35
Estrategia experimental.....	36

Material y método.....	37
Western blot.....	37
Inmunofluorescencia indirecta.....	38
Ensayo de viabilidad por azul de Tripano	38
Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i> en presencia de iones metálicos.....	39
Extracción de ARN total.....	39
Síntesis de cDNA.....	40
Amplificación por RT-PCR.....	41
8. Resultados	43
8.1 Análisis de expresión de <i>tvrads51</i> de <i>T. vaginalis</i>	43
8.2 Ensayo de viabilidad.....	46
8.3 Cinética de expresión TvRAD51 en presencia de Zn ²⁺ y Cd ²⁺	48
8.4 La inmunodetección de la proteína TvRAD51	50
8.5 Expresión de TvRAD51 en respuesta a Cd ²⁺	52
8.6 Localización de la proteína TvRAD51 de <i>T. vaginalis</i> en presencia de Zn ²⁺ 54	
8.7 Localización de la proteína TvRAD51 en <i>T. vaginalis</i> en presencia de Cd ²⁺ 56	
9. Discusión	58
10. Conclusiones.....	61
Referencias.....	62
12. Anexos.....	70

Índice de tabla

Tabla 1: Esquema de tratamiento oral con metronidazol y tinidazol.

Índice de figuras

- Figura 1:** Epidemiología de tricomoniasis en México
- Figura 2:** Mecanismos de acción de los nitroimidazoles
- Figura 3:** *Trichomonas vaginalis* observado en medio de cultivo.
- Figura 4:** Ciclo biológico de *Trichomonas vaginalis* en el ser humano.
- Figura 5:** Mecanismos de patogénesis de *T. vaginalis*.
- Figura 6:** Esquema de la recombinación homóloga.
- Figura 7:** Vista estructural de los complejos de filamentos presinápticos y postsinápticos RAD51 en humanos.
- Figura 8:** Proteína RAD51 y sus motivos y dominios.
- Figura 9:** Análisis de los dominios compartidos con otros organismos.
- Figura 10:** Proteínas encontradas en RH.
- Figura 11:** Expresión del gen *tvrad51* en *T. vaginalis* en condiciones de Zn²⁺
- Figura 12:** Expresión del gen *tvrad51* en *T. vaginalis* en condiciones de Cd²⁺
- Figura 13:** Análisis de viabilidad de *T. vaginalis* tratados con cationes.
- Figura 14:** Perfil proteico de extractos de *T. vaginalis* tratados con diferentes concentraciones de cationes.
- Figura 15:** Abundancia de la proteína TvRAD51 en *T. vaginalis* con tratamientos de Zn²⁺
- Figura 16:** Abundancia de la proteína TvRAD51 en *T. vaginalis* con tratamientos de Cd²⁺
- Figura 17:** Localización de la proteína TvRAD51. Tratamiento de Zn²⁺.
- Figura 18:** Localización de la proteína TvRAD51. Tratamiento de Cd²⁺
- Figura 18:** Expresión del gen *tvrad51* en *T. vaginalis* en condiciones de Zn²⁺ y Cd²⁺.

Abreviaturas

2 Fe -2S	Ferredoxina
ADNss	ADN monocatenario
ATP	Adenosín trifosfato
CP	Cisteína proteinasa
dsADN	ADN bicatenario
DSB	Roturas de doble cadena
ETS	Enfermedad de transmisión sexual
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
Fn	Fibronectina
Hb	Hemoglobina
HR	Recombinación homóloga
Inr	Elemento promotor
ITS	Infección de transmisión sexual
Mb	Mega base
MEC	Matriz extracelular
MEC	Matriz extracelular
NAAT	Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
PFO	Piruvato ferredoxina oxidoreductasa
pH	Potencial de hidrógeno
R-N02	Radicales libres.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Utr	Región no traducida
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

La tricomoniasis es una infección de transmisión sexual que afecta a mujeres como a hombres en el mundo. El agente causal es el parásito *Trichomonas vaginalis* el cual es un parásito que tiene factores de patogenicidad muy amplios y desarrollados para la supervivencia del parásito en el hospedero. Necesita de algunos metales presentes en el organismo para su supervivencia, en el caso de los hombres los metales Zn^{2+} y Cd^{2+} están presentes en el tracto urogenital y fluidos prostáticos, ayudando a tener un efecto antimicrobiano y afectando al material genético del parásito. Por eso ha generado respuestas a estos daños con ayuda de proteínas especializadas en la reparación del material dañado y recombinación homóloga como lo es la proteína RAD51.

Introducción

1. Antecedentes generales

1.1 Tricomoniasis

La tricomoniasis es una infección crónica no mortal tratable y curable, el agente causal es *Trichomonas vaginalis*, un parásito flagelado cosmopolita, que tiene un impacto negativo en la salud sexual de hombres y mujeres (Van *et.al.*, 2023). La mayoría de las mujeres con tricomoniasis son sintomáticas, en el caso de los hombres la infección es generalmente autolimitante solo el 3% presentan sintomatología. (Cerrada Bravo, 2006).

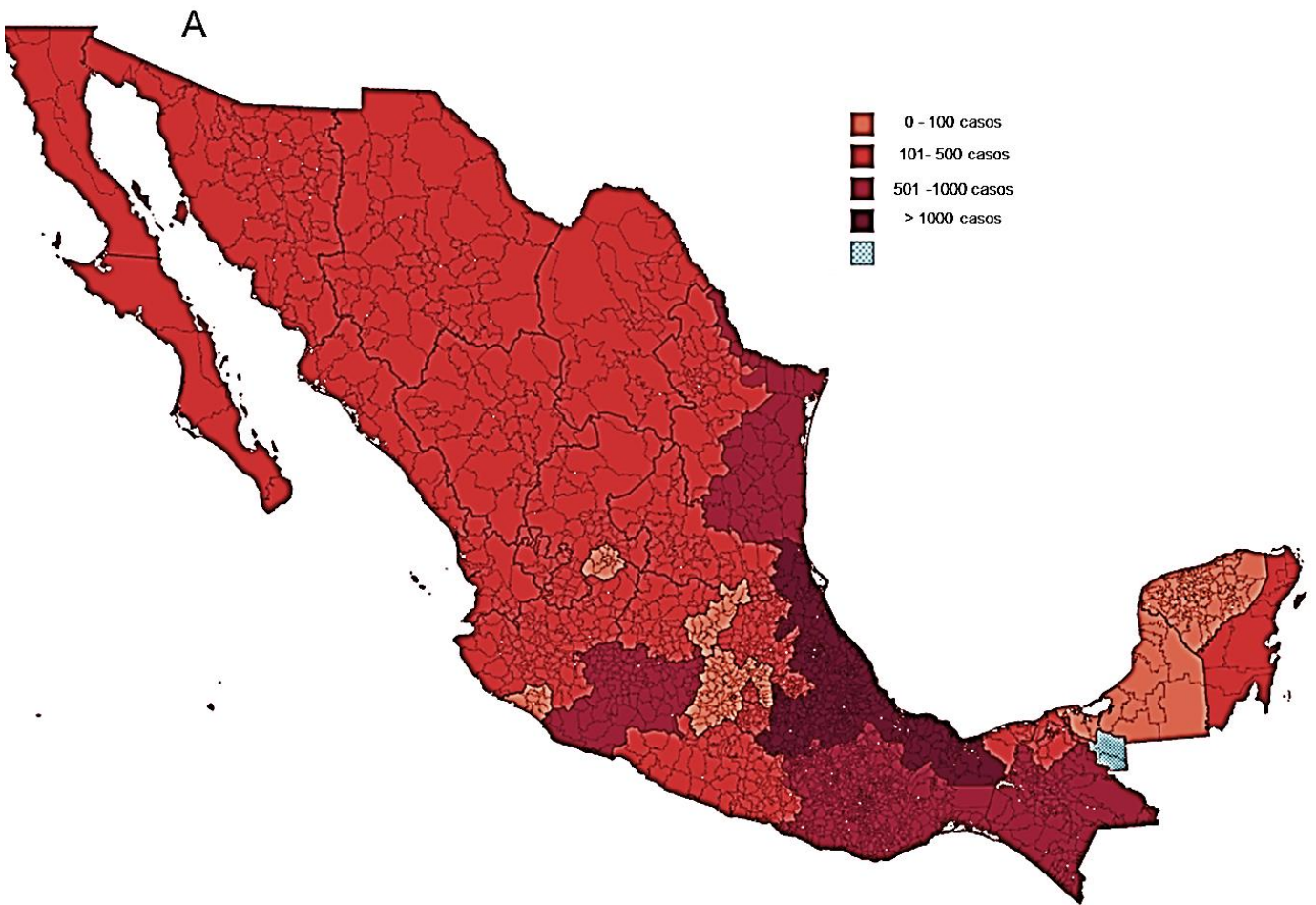
Los signos y síntomas de la infección en mujeres son: secreción vaginal o en la uretra, dolor o picazón en las zonas de los genitales, enrojecimiento de la zona afectada, descamación, disuria que es el dolor y ardor al orinar o hemorragias leves, presenta mal olor, flujo excesivo y dispareunia (dolor durante las relaciones sexuales) (Petrin *et al.* 1998). En el caso de los varones la mayoría de las veces son asintomáticos y llegan a presentar síntomas como irritación o picazón dentro del aparato reproductor, ardor después de orinar o eyacular y pueden presentar secreciones mal olientes, uretritis, prostatitis, epididimitis (Mercer y Johnson, 2018), infertilidad y balanopostitis (Gopalkrishnan *et al.*, 1990). Las consecuencias de la tricomoniasis en mujeres embarazadas son parto prematuro (Perazzi, *et.al.*, 2007), infantes de bajo peso al nacer (Kissinger *et.al.*, 2009), y adquisición y del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Schwebke y Burgess 2004).

1.2 Epidemiología

La tricomoniasis es una infección que se estima que afectó a 156 millones de personas en el año 2023 según los datos oficiales de la organización mundial de la salud (OMS, 2023).

La infección se puede presentar desde el comienzo de la actividad sexual de las personas, generalmente desde los 19 hasta los 59 años de edad, no antes de la menarca ni después de la menopausia (Patel. *et.al.*, 2018).

La tricomoniasis no es una infección de transmisión sexual de declaración obligatoria en todos los países, solamente en los Estados Unidos de América (Rowley *et.al.*, 2019), por lo que el número de casos puede estar subestimado. En México, el número de casos reportados de tricomoniasis en el boletín epidemiológico del sistema nacional de vigilancia es de 21,378 para la semana 33, siendo los estados de Michoacán, Jalisco, Chiapas, Veracruz y la Ciudad de México los más afectados. Es difícil conocer el número exacto de casos debido a que esta infección no pertenece al sistema de vigilancia epidemiológica por lo que estos números podrían estar subestimados (Secretaría de Salud, 2024) (Figura 1).



B Epidemiología de tricomoniasis en México

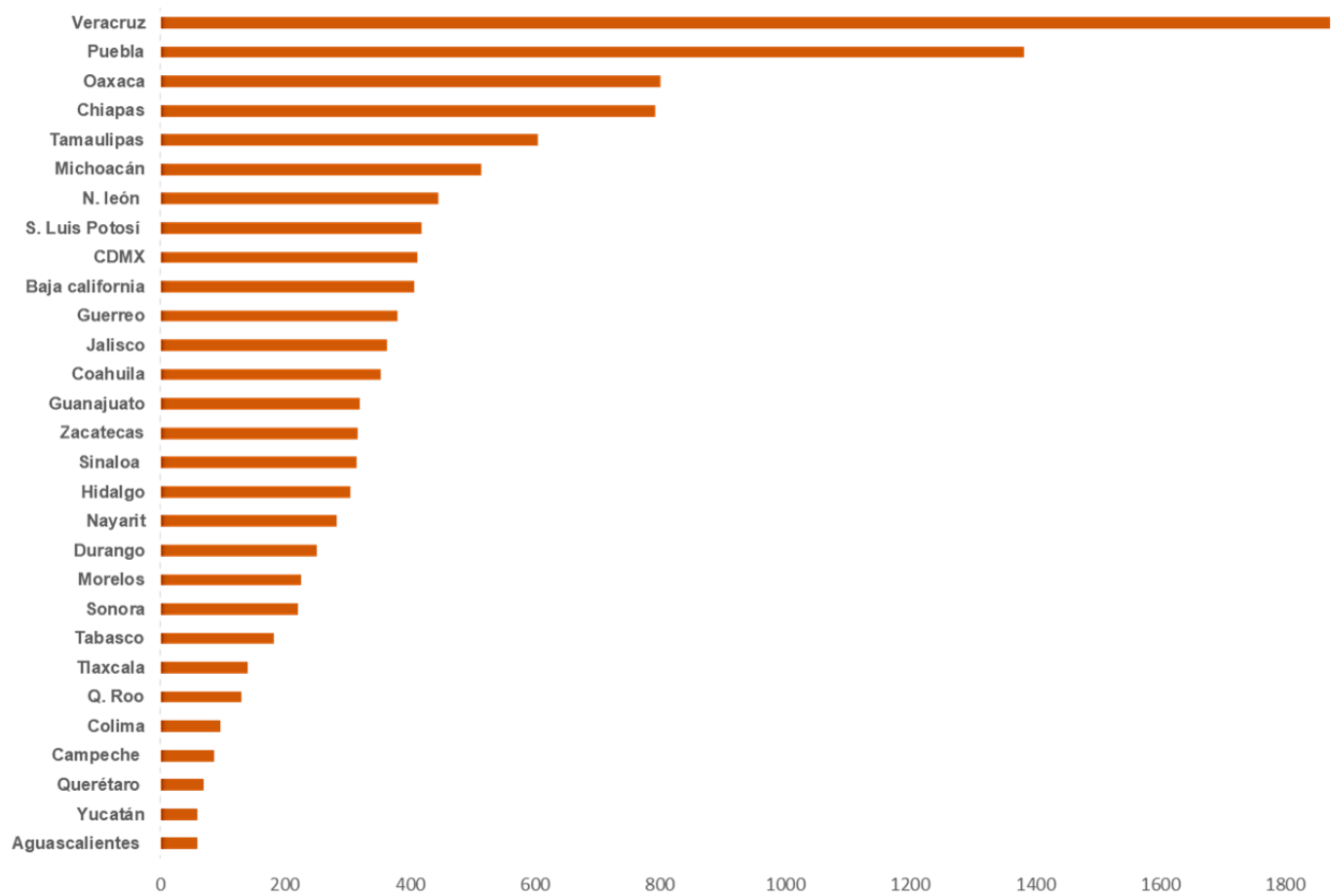


Figura 1: A) Epidemiología de tricomoniasis en México, representación en base colores. B) Gráfica de número de casos reportados en 2023 en los estados de la República Mexicana representados de mayor a menor.

1.3 Diagnóstico

Existen varios métodos para el diagnóstico de la tricomoniasis, en las mujeres se realizan estudios como la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), cultivo o citología cervical, pruebas rápidas de antígeno o exámenes de microscopía, para evaluar la infección o la vaginosis bacteriana. En el caso de los hombres el diagnóstico se puede realizar mediante un urocultivo o un hisopado de la uretra, donde se obtiene una muestra que es enviada a laboratorio donde se procede al cultivo del parásito durante una semana, o se analiza bajo un microscopio la presencia o no de parásitos (Rojas, 2024).

El cultivo en medio Diamond es considerado el estándar de oro para la detección de *T. vaginalis*. El medio está compuesto por el caldo de extracto de carne, extractos de levadura, azúcares indispensables como lo son la glucosa y maltosa, sales (cloruro de sodio y fosfatos de sodio), agar y suero de caballo. Este medio permite el crecimiento adecuado del parásito y es único para el crecimiento del parásito inhibiendo el crecimiento de otros parásitos por sus especificaciones para *T. vaginalis* (Ana *et.al.*, 2024).

A través de la colposcopia se han detectado lesiones amarillentas o blancas, inflamación del cuello uterino y la vagina presentando una inflamación (edema), descamación, enrojecimiento de la mucosa (eritema), pérdida o cambios en la vascularidad, úlceras o erosiones en la zona afectada entre otras (López *et.al.*, Gasull, 2011).

1.4 Tratamiento

El medicamento por excelencia para tratamiento de esta infección es el metronidazol (MTZ), antibiótico antiparasitario derivado del hongo (*Azomocina*) siendo su principal función bactericida, amebicida y tricomonocida (Osato, 2019). Es considerado el fármaco de referencia para estas infecciones, y el único aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para el tratamiento de la tricomoniasis. La dosis de este medicamento es dependiente de la edad, o la etapa de avance de la infección (Drinkwater, 1987).

El tratamiento con MTZ puede ser individual o prescribirse a las parejas con vida sexual activa (Drinkwater, 1987) (Tabla 1). El MTZ se metaboliza y acumula en el interior del parásito para transformarse en un agente activo, que penetra por medio de difusión pasiva

a través de la pared celular del parásito. La enzima responsable de la activación del MTZ es la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) y, cuando el MTZ se encuentra en el interior del hidrogenosoma compete con la ferredoxina (Fd) por los electrones causando una transferencia al grupo NO₂ del fármaco. Cuando se presenta un potencial redox (486 mV) se produce la activación del MTZ causando su reducción y activación disminuyendo así el hidrogeno del parásito. (Moreno y Docampo 1985) Durante el proceso de acción del fármaco se generan intermediarios tóxicos (radicales como anión, hidronitróxido y amino catiónico) que actúan sobre residuos de adenina y timina del ADN del parásito, generando así rupturas en las cadenas (sencillas y dobles) generando la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas provocando así la muerte del parásito (Figura 2) (Knox *et.al.*, 1981).

Existen dos tipos de resistencia al MTZ como lo es la resistencia aeróbica la cual está basada en la reoxidación de aniones tóxicos del metronidazol por la presencia de oxígeno, generando la conversión del MTZ de forma reducida a forma oxidada causando la disminución del efecto en el interior del hidrogenosoma (Moreno y Docampo 1985). También se observa resistencia anaeróbica por medio de modificaciones del parásito que puede tener un 50% de reducción de enzimas importantes para la activación del MTZ como lo puede ser PFOR, Fd, malato deshidrogenasa o NADH oxidasa (Rasoloson *et al.* 2001).

Tabla 1: Esquema de tratamiento oral con metronidazol y tinidazol (Obtenido y modificado de Ibáñez-Escribano y Gómez-Barrio, 2017).

Tratamiento	Fármaco	Dosis (g)	Duración
Infecciones vaginales	Metronidazol	2 g	Dosis única
Alternativa de Infecciones vaginales	Tinidazol/ Metronidazol	2 g	2 veces por 7 días
Infecciones uretrales	Tinidazol/ Metronidazol	400 mg a 500 mg	2 veces por 7 días
Infecciones neonatales	Tinidazol/ Metronidazol	400 mg a 500 mg	3 veces por 5 días

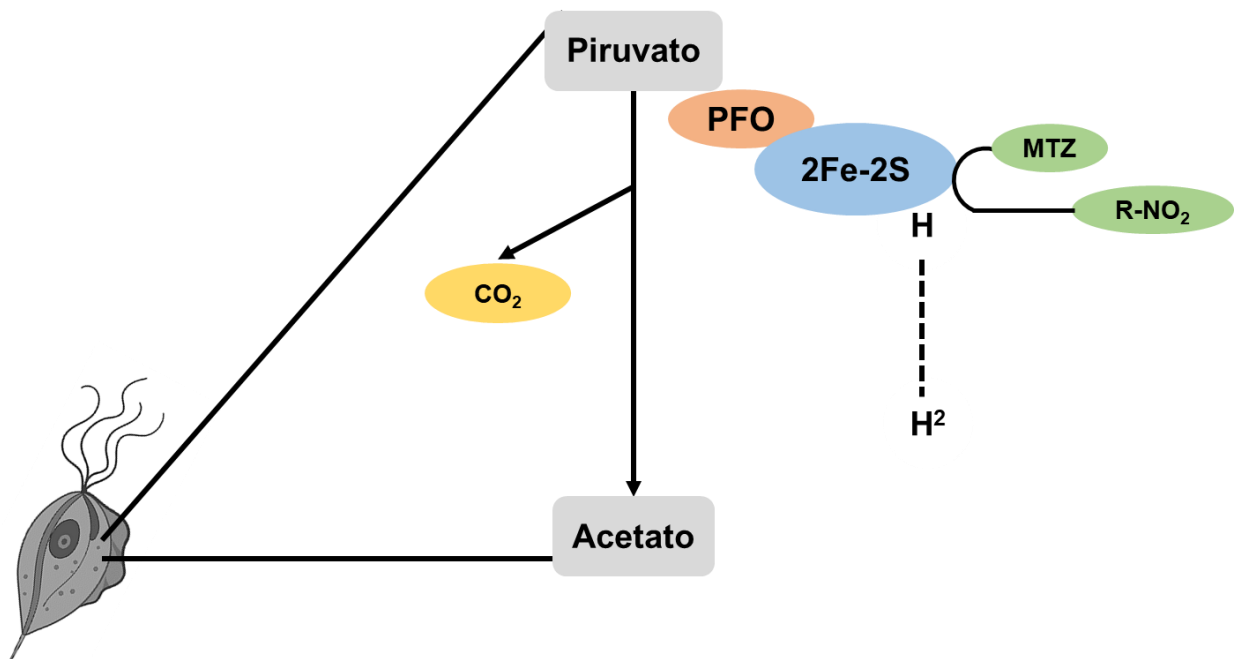


Figura 2: Mecanismos de acción de los nitroimidazoles. 1) Penetración del fármaco por difusión pasiva a través de la pared celular de *T. vaginalis* y se incrementa por el nivel de reducción intracelular. 2) Activación del mtz por: la ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) y la flavodoxina que produce dos compuestos tóxicos llamados N-2-hidroietil del ácido oxámico y acetamida. 3) Acción sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *T. vaginalis*. Tomada y modificada de (Pérez navarro, PCG, 2018).

2. Biología de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis fue observado por primera vez por el científico Alfred Donné en el año de 1836 en cultivos de exudado uretral y vaginal en el humano (Field *et.al.*, 2016). Este parásito está presente en el ser humano, específicamente en la vagina, pene próstata, uretra y cuello uterino y es catalogado como un parásito de transmisión sexual (Harp y Chowdhury, 2011). En las mujeres las tricomonas se localizan en los conductos vaginales o uretrales y en los varones se ve localizado en las glándulas de la próstata. La infección se transmite por trofozoítos los cuales se presenta únicamente bajo determinadas condiciones fisiológicas, como lo es determinado pH alcalino presente durante el ciclo menstrual de las mujeres. El trofozoíto contagia a un nuevo huésped solamente por contacto sexual. Fuera del huésped la supervivencia del parásito es escasa ya que no tiene una tolerancia a temperaturas mayores a 40 °C y no tiende a sobrevivir en medios líquidos como el agua o a una constante exposición a la luz directa (Pereira y Pérez, 2003) ni en ambientes adversos como el exterior del cuerpo humano o en pH inadecuados (Bouchemal, *et.al.* 2017) (OXIGENO)

2.1 Características de *T. vaginalis*

T. vaginalis es microaerófilo con una forma de vida anaeróbico y requiere de sistemas redox, así como sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos que provoca el oxígeno (Martin Embley y Martin 2006). Puede modificar su morfología bajo determinadas condiciones fisicoquímicas como el pH, la temperatura o falta de nutrientes. El parásito tiene una variabilidad en su morfología teniendo un aspecto piriforme, semilunar o esferoide en un medio líquido (Diéguez, 2014) y es capaz de cambiar de una forma ovoide a una forma ameboide para tener mayor adherencia a las células del epitelio vaginal o de la próstata (Pereira *et al.*, 2003). El único estadio en el que se encuentra es el de trofozoíto y se ha observado que cuando el parásito internaliza sus flagelos se puede encontrar en una forma de pseudoquiste siendo una forma reversible siempre y cuando el parásito se vuelva a encontrar en las condiciones medioambientales adecuadas (Bouchemal, *et.al.* 2017).

El tamaño de *T. vaginalis* es de 9 a 23 μm de largo y aproximadamente 7 μm de ancho. El parásito tiene 5 flagelos (4 de ellos en el extremo anterior y el otro en el extremo posterior), así como un parásito pentaflagelado. Cada flagelo contiene axonemas conformados por nueve microtúbulos encontrados cerca del cuerpo basal, estos flagelos en conjunto a una membrana ondulante que tiene una longitud a la mitad del parásito y se encuentra sostenida por una costa (Cheon *et.al.*, 2013), que le confieren el movimiento al parásito (Kent, 1991) (Figura 2).

El núcleo del parásito no se fragmenta durante el proceso de mitosis lo que da lugar a que los cromosomas se separen dentro de la membrana nuclear y pasos después mediante una acción parecida a la estrangulación se da lugar a la formación de dos núcleos (Pereira Neves, *et.al.*, 2003).

T. vaginalis carece de mitocondria, pero posee un hidrogenosoma el cual es el principal responsable de la formación de adenosín trifosfato (ATP), a partir del uso del metabolismo del piruvato. El organelo se presenta en la región paracostal y paraxostilar y tiene una forma esférica con un diámetro de ~ 0.2 a 1 μm , contiene grandes cantidades de Mg^{2+} , Ca^{2+} y P. Produce ATP por medio de la oxidación de piruvato y malato en condiciones anaeróbicas, donde el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa por acción de la PFOR (Gould *et.al.*, 2019), formando así acetato, H_2 , y CO_2 . Una proteína importante para este orgánulo es la Fd, que actúa como transportadora de electrones y cuando se reduce por medio de una oxidoreductasa, vuelve a ser oxidada por medio de una hidrogenasa (HD) produciendo así hidrogeno molecular, malato, acetato, glicerol. El hidrogenosoma comúnmente es el blanco de tratamientos farmacológicos que pueden inducir su autofagia (Benchimol *et.al.*, 2001).

El parásito puede ser fagocitado por macrófagos como un mecanismo de defensa del hospedero, aunque el parásito ha desarrollado mecanismos para evadir la fagocitosis y tener una supervivencia dentro del hospedero, como la síntesis de proteínas que inhiben la activación de macrófagos o tener una adherencia a la célula epiteliales para tener un mimetismo y evadir el sistema inmunitario (Apot, 2013).

T. vaginalis contiene un aparato de Golgi de un tamaño de 6 μm de largo con $\sim 1 \mu\text{m}$ de anchura, tiene la presencia de 8 a 12 dictiosomas en la cual las membranas son de forma fenestradas, la cual hacer que no exista una división durante el proceso de la mitosis (Benchimol *et.al.*, 2001).

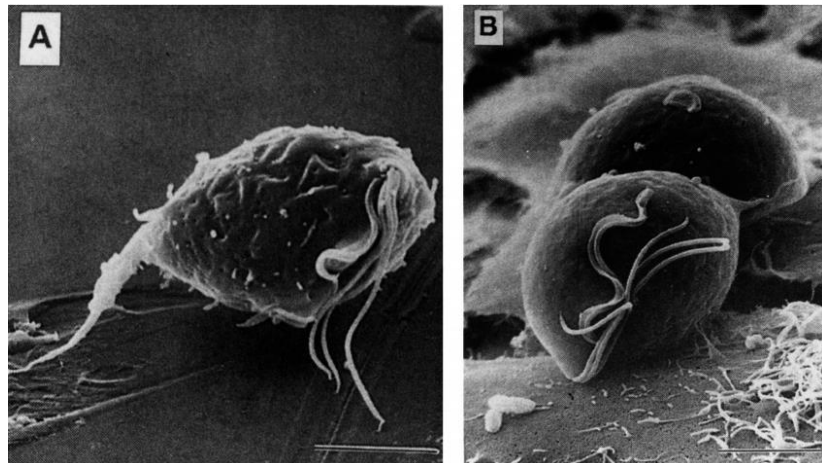


Figura 3: A) Parásito observado en medio de cultivo, se observan axostilo, flagelos y la membrana ondulante. **B)** Parásito *T. vaginalis* observado en la superficie epitelial de las células vaginales. (Foto tomada de Petrin y *et.al.*, 1998).

2.2 Ciclo biológico del parásito *T. vaginalis*

T. vaginalis es un parásito de reproducción rápida ya que utiliza la fisión binaria longitudinal (Cudmore *et.al.*, 2004) (Figura 3). La transmisión del trofozoíto es de carácter sexual, a través del contacto de dos personas donde se ven involucrados fluidos vaginales, líquido preseminal o el semen. El riesgo aumenta cuando se tienen múltiples parejas sexuales y relaciones sexuales sin protección. También se han visto casos escasos donde se ve involucrada un contagio de una madre a un recién nacido (Pereira y Pérez, 2003).

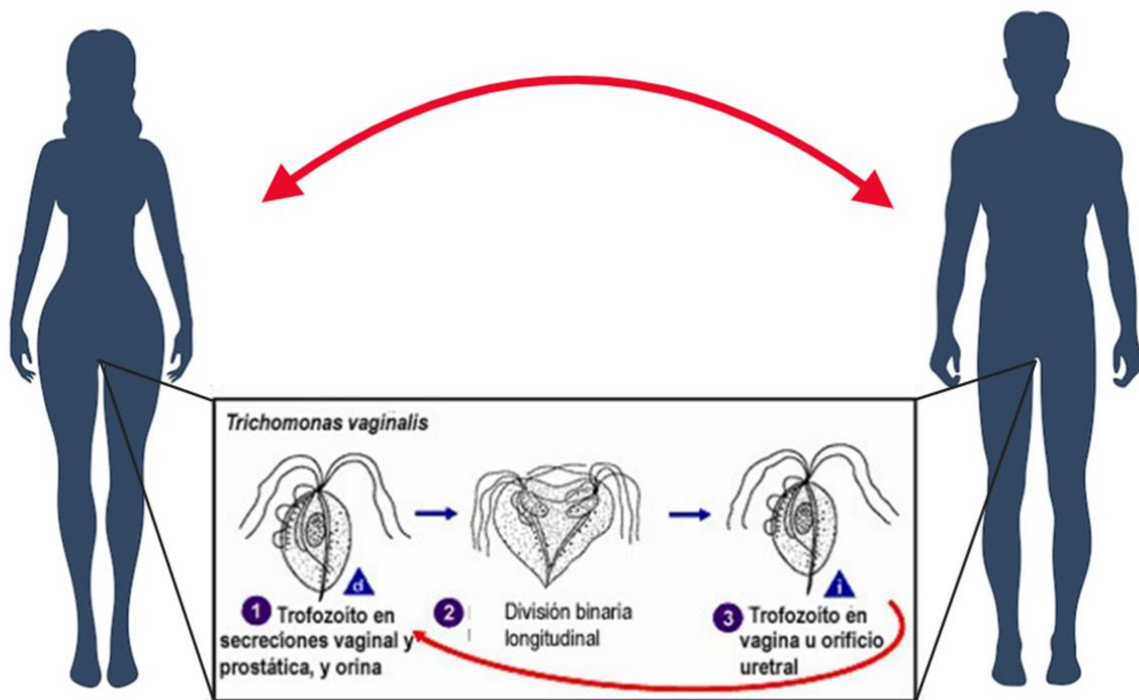


Figura 4: Ciclo biológico de *Trichomonas vaginales* en el ser humano (CDC, 2024).

2.3 Estructura genómica de *T. vaginalis*

T. vaginalis tiene un genoma de gran tamaño constituido por 160 MB organizados en seis cromosomas. Tiene un porcentaje muy alto de Adenina y Timina, ~65% de su genoma es repetitivo, y está compuesto por 59 familias génicas repetidas en la cual existen varios elementos elevados transponibles y secuencias que codifican proteínas presentes en bacterias como *Treponema pallidum* y *Chlamydia poxvirus*, y en virus como el VIH y otros parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Leishmania major* y *Giardia duodenalis* (Carlton *et.al.*, 2007).

El genoma de la tricomona contiene ~60,000 genes codificantes, con una expansión elevada de genes lo que ayuda al parásito a una mayor adaptación para su supervivencia y patogénesis. Estos genes están involucrados en procesos fundamentales como endocitosis de proteínas y fagocitosis de bacterias y células del huésped. También se encuentran genes relacionados para la codificación de cinasas utilizadas como sistema de anclaje y señalización para el parásito (Richards y Smith, 2005).

El parásito contiene el elemento promotor en un ~75% de las secuencias de la región 5' no traducida (UTR) (Schumacher, *et.al.* 2003). El genoma del parásito fue secuenciado por el uso de la metodología *shotgun*, y se han identificado intrones en 65 genes ARN de transferencia (ARNt) y ~250 unidades de ADN ribosómico (ADNr), además, se identificaron genes que pueden codificar para una variedad de moléculas como superóxido dismutasa, tiorredoxinas reductasas, peroxirredoxinas y rubreritinas (Carlton y Hirt, 2007). *T. vaginalis* presenta además homólogos de proteínas involucradas en procesos de reparación del material genético, restauración de la cromatina y en procesos complejos como la meiosis donde se cree que son vestigios evolutivos del parásito (Ramesh, *et.al.* 2005).

Además, se han identificado en el parásito de 27 a 29 genes involucrados en la mitosis o la reparación del material genético. Entre los genes más importantes se encuentra *spo11*, el cual una vez codificada su proteína, crea las roturas de la doble cadena (Keeney, Giroux y Kleckner, 1997), o genes específicos en procesos como recombinación como *dmc1*, el cual codifica para la proteína DMC1, un miembro de la súper familia de las recombinasas, la cual es importantes para la reparación de las roturas de ADN de doble cadena durante la mitosis y la meiosis y también se encuentra el gen de *rad51* que codifica para la proteína RAD51 la cual es uno de los responsables de apareamiento de las cadenas durante los mecanismos de recombinación (Masson y West, 2001).

2.4 Patogénesis de la tricomoniasis

El parásito presenta mecanismos de virulencia como lo son una unión y degradación de componentes de la mucosa y la matriz extracelular (MEC), citoadherencia, citotoxicidad, fagocitosis y una evasión del sistema inmune por procesos de apoptosis o endocitosis (Benchimol *et.al.*, 2007) (Figura 4).

2.4.1 Citoadherencia

Este proceso es clave para establecer y mantener la infección del parásito en el tracto urogenital del humano, es considerado el primer paso para la infección con el uso de glicoconjugados (colágeno fibronectina laminina), proteínas de superficie, receptores de proteínas de matriz extracelular, proteínas del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos) y adhesinas. El catión Fe^{2+} incrementa y regula positivamente la síntesis de adhesinas en el parásito. Las 5 adhesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23) caracterizadas en el parásito se encuentran en la superficie e interactúan con la célula blanco y las proteínas de unión a fibrinectina como lo es TvGAPDH (Alderete *et.al.*, 2001).

También este parásito cuenta con cisteína proteinasas (CPs) presentes en la superficie del parásito como TvCP30 y TvCP62, las cuales degradan proteínas del medio vaginal como fibronectina (Fn), hemoglobina (Hb) y colágeno (Arroyo *et.al.* 1993).

2.4.2 Citotoxicidad

Estudios demuestran que la patogenicidad del protozoo es un proceso de múltiples pasos, comenzando con la citoadherencia y dando seguimiento a la citotoxicidad con procesos como desintegración de la monocapa de la célula, citólisis y fagocitosis. En este paso se producen varias moléculas citotóxicas que producen un daño en la membrana de las células epiteliales. Varias moléculas implicadas como porinas, fosfolipasas y un conjunto de CPs como lo son TvCP12, TvCP39 (Hernández-Gutiérrez *et.al.*, 2004) y TvCP65 (Álvarez Sánchez *et.al.*, 2000) presentes en la superficie del parásito (Fernando, 2018).

2.4.3 Fagocitosis

La fagocitosis es un mecanismo de virulencia donde el parásito adquiere iones como el Fe^{2+} , lípidos, lactobacilos, leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, levaduras, espermatozoides y células prostáticas (Midlej y Benchimol, 2009). Aunque no se han descrito el mecanismo ni se han identificado las moléculas específicas que participan en estos procesos, se han descrito diferentes vías como la migración utilizada por fagocitos en la que un pseudópodo se dirige a la célula blanco y posteriormente es fagocitada. Análisis *in silico* demuestran una diversidad de proteínas que componen la maquinaria de transporte y se han identificado homólogos de componentes ya establecidos en la formación de vesículas como GTPasas, SNARE, proteínas SM (Alderete *et.al.*, 2001).

2.4.4 Hemólisis

Los eritrocitos son una de las principales fuentes de nutrientes del parásito, la lisis del parásito depende del contacto donde se ven implicados factores citolíticos de las CPs de la superficie (Lehker *et.al.*, 1990). Se ha observado que una CP puede producir alteraciones en el citoesqueleto de *T. vaginalis* para facilitar la lisis de eritrocitos y este proceso depende de varios factores como la concentración de Ca^{2+} , temperatura (37 °C) y el pH (≤ 6.5). (Fiori, *et.al.*, 1999).

2.4.5 Apoptosis

En el parásito, las cisteínas proteasas (CPs) CP2, CP3, CP4 y CPT (TvCP39) están reguladas por el ion Fe^{2+} , el cual es esencial para su activación y actividad proteolítica. Estas CP's juegan un papel clave en la patogenicidad del parásito y se ha propuesto que están involucradas en el inicio de la apoptosis en las células del huésped, contribuyendo al desarrollo de la infección. (Kummer, *et.al.*, 2008). Las CPs de *T. vaginalis* podrían desencadenar una respuesta apoptótica activando caspasas en la célula del huésped. Esta activación llevaría a la fragmentación del ADN y a otros eventos morfológicos típicos de la apoptosis (Carton, *et. al*, 2007). Se ha sugerido que las CP's también podrían influir en esta vía, alterando la función mitocondrial y promoviendo la liberación de factor Iniciador de Apoptosis (Modeo *et. al* 2002). El Fe^{2+} regula la actividad de estas proteasas, y la disponibilidad de este ion influye en la virulencia de *T. vaginalis*. El Fe^{2+} no solo modula la expresión de las CP's, sino que también aumenta la capacidad del parásito para invadir y dañar las células del huésped (Lehker, *et.al* 2000).

2.4.6 Evasión del sistema inmune

El parásito causa infecciones vaginales crónicas y se encuentra en constantes cambios de microambiente como lo es en el caso del ciclo menstrual, por lo cual ha desarrollado una variedad de mecanismo de evasión al sistema inmunitario del hospedero (Ryu *et.al.*, 2001). Tiene proteínas que degradan inmunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA (Hernández-Gutiérrez *et.al.*, 2004). Tiene una Cp que además de suministrar nutrientes por medio de la degradación de hemoglobina puede degradar inmunoglobulinas. Puede generar un mimetismo teniendo un recubrimiento en la membrana del parásito con moléculas que son homologas al hospedero, lo que también evita que el sistema inmunológico del reconozca como extraño (Ho Chang, *et.al.*, 2006).

3. Iones metálicos en el tracto urogenital masculino

El tracto urogenital masculino contiene una diversidad de metales esenciales que desempeñan funciones cruciales en la fisiología normal, así como un mecanismo de protección contra infecciones y el mantenimiento de la homeostasis. En los fluidos del tracto urogenital masculino, como el plasma seminal y el fluido prostático, se encuentran varios iones importantes, incluyendo el hierro (Fe^{2+}), el zinc (Zn^{2+}), el calcio (Ca^{2+}), el magnesio (Mg^{2+}) por mencionar algunos (Mendiola *et.al.*, 2011).

3.1 Hierro Fe^{2+} en el tracto urogenital masculino

Es un metal importante para procesos biológicos como la síntesis del ADN, transporte de electrones o transporte de oxígeno, forma parte de mioglobinas, hemoglobulinas y el sistema cromático, tiene participación en activación de diversas enzimas. En concentraciones fisiológicas normales se encuentra en hombres en un rango de 0.8 a 1.68 mg/L (Lynch, *et.al*, 1984). El metal es crucial para el parásito *T. vaginalis* teniendo papel en el mantenimiento de la infección del mismo al hospedero, participa directamente en citoadherencia, resistencia al sistema complementario, puede inducir la apoptosis de la célula hospedera y en la disminución de la citotoxicidad. El parásito también puede obtener el metal de lactoferrina y hemoglobulina, puede ayudar a la fisiología y morfología del parásito teniendo impacto directo con proteínas que realizan estos cambios morfológicos (Lehker, *et.al*, 1990). Además, se ha demostrado que las CP, como CP2, CP3, CP4 y CPT (TvCP39), están reguladas de manera dependiente del Fe^{2+} , y su actividad es crucial para la interacción con las células del huésped (García, *et.al*, 2003).

3.2 Magnesio (Mg²⁺) y Manganeso (Mn) en el tracto urogenital masculino

El Magnesio y el manganeso se encuentran en el semen y en otros fluidos del tracto urogenital masculino. Son esenciales para la actividad enzimática, ya que son un cofactor en muchos procesos bioquímicos, incluidas las reacciones relacionadas con el ADN y ARN, así como en la síntesis de proteínas. El magnesio también contribuye a la movilidad y viabilidad de los espermatozoides y se encuentra en una concentración fisiológica normal en un rango de 1 - 5 mg/L. Mientras el manganeso se encuentra en concentraciones de 5-15 µg/L (Kumar, *et.al*, 2017).

3.3 Zinc (Zn²⁺) en el tracto urogenital masculino

El Zn²⁺ es un metal implicado en diversos procesos biológicos, con funciones fisiológicas que van desde la síntesis del ADN y ARN, crecimiento celular, sistema inmune, estabilización de la estructura terciaria de las enzimas (forma conocida como “dedos de zinc”) que permite la unión al ADN para la transcripción, reparación celular y en la integridad de la membrana. El Zn²⁺ también tiene implicaciones importantes en el equilibrio redox, apoptosis. El Zn²⁺ se encuentra en el tracto reproductivo del hombre, principalmente en el fluido prostático en concentraciones de 2.5 a 6 mg/L y su presencia en las secreciones prostáticas tiene una función en la defensa antimicrobiana hacia bacterias, virus y algunos hongos, además de un efecto tricomonocida lo que contribuye a combatir la infección por el parásito en hombres. En una concentración menor a 1.6 mM se pueden presentar casos de infección por *T. vaginalis* (Vázquez, *et.al*, 2011).

Este metal es necesario para la actividad de varias metaloproteasas que el parásito utiliza para invadir y degradar los tejidos del hospedero, incluidas las cisteína proteasas (CPs) y otras enzimas involucradas en la degradación celular. (Krieger, *et.al.*, 1982) Se ha identificado a la metaloproteinasa TvMP50 modulada por Zn²⁺, la cual se ha observado que se sobre expresa en presencia del catión y se puede asociar a la supervivencia del parásito (Quintas Granados *et.al.*, 2013, Puente Rivera *et.al* 2017).

3.4 Cadmio (Cd^{2+}) en el tracto urogenital masculino

Es un metal que se obtiene directamente de la dieta mediante el consumo de vegetales contaminados con pesticidas en los cuales se encuentran cereales, arroz, espinacas o lechuga, mientras que de origen animal se obtiene mediante el consumo de mariscos y moluscos (OMS, 2011)

Este metal tiene implicaciones directas en los testículos y provocar un daño en la producción de espermatozoides y hormonas, puede generar espermatogénesis y bajar a calidad del espermatozoides que ese ve asociado a una infertilidad, también puede inducir a un estrés oxidativo y alterar la integridad del ADN (Bernard, *et.al*, 2008).

En el tejido prostático normal se tiene en concentraciones por debajo de los 2 mg/L, mientras que en el líquido seminal las concentraciones son más bajas de 0.1 mg/L (Waalkers, *et.al*, 2003). En los hombres el Cd^{2+} puede tener un papel en defensa antimicrobiana al tener un efecto tricomonocida para combatir al parásito en el hombre En una concentración menor a 0.1 mM se pueden presentar casos de infección por *T. vaginalis* (Vázquez, *et.al*, 2011).

Se ha estudiado una metalotioneína (MT) que esta inducida a una respuesta de estímulos por cationes y está implicada en la supervivencia y adaptación del parásito al microambiente del tracto urogenital del hombre, donde además de estar presente metales como el Zn^{2+} también se observa el Cd^{2+} , aunque los mecanismos moleculares aún no están descritos se han, se ha predicho que funcione para la desintoxicación de metales pesados para la supervivencia del parásito (Netzahualcoyotzi *et.al.*, 2019).

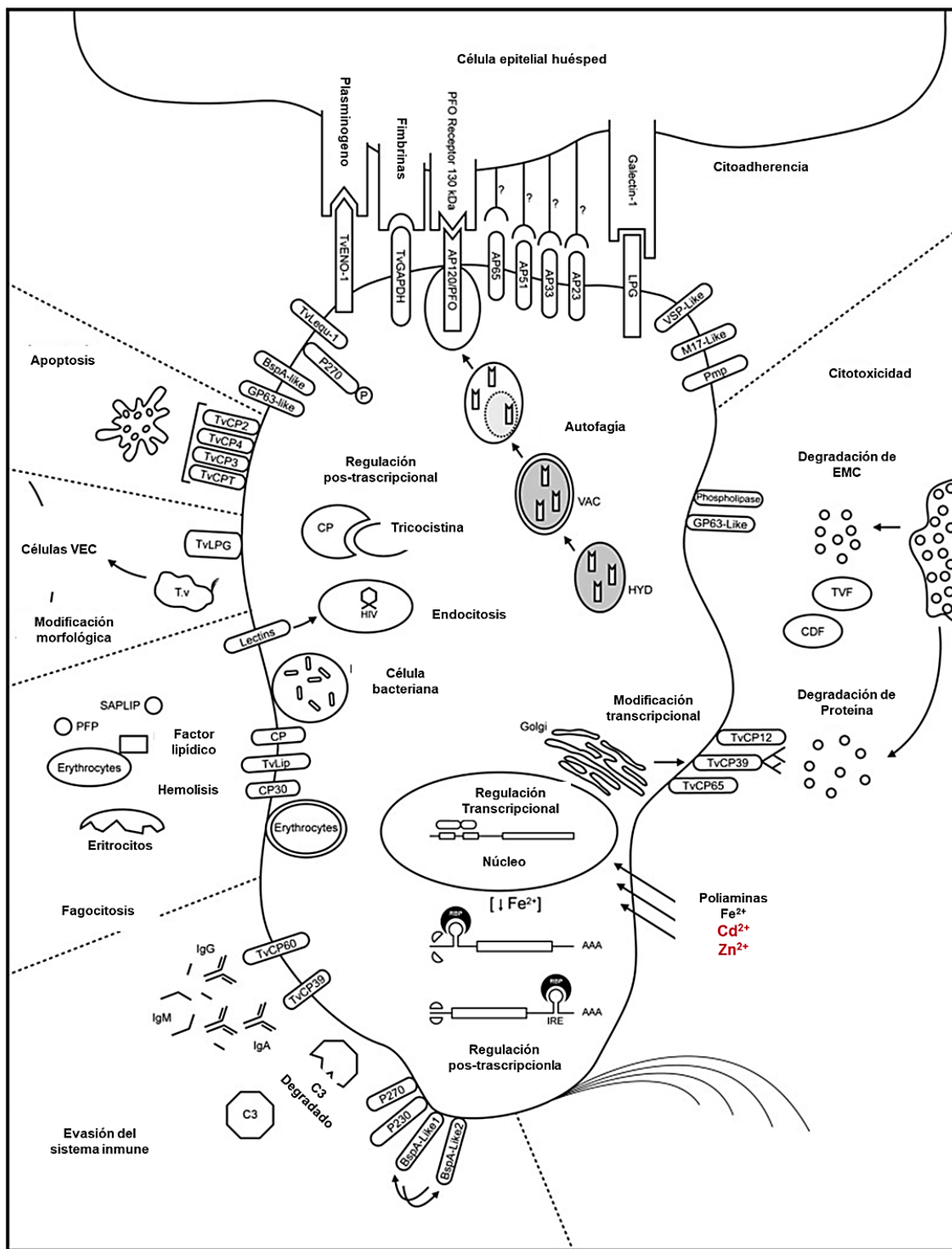


Figura 5: Mecanismos de patogénesis de *T. vaginalis*, en donde se ven involucradas proteínas, enzimas que son utilizadas por el parásito para la supervivencia en el hospedero, así como degradación, apoptosis, citotoxicidad, citoadherencia, hemólisis y otros factores. También se observa la presencia de metales importantes para estos procesos (Obtenida y modificada de Figueroa Angulo *et.al.*, 2012).

4. Daño al material genético

El material genético es susceptible al daño debido a factores ambientales, agentes genotóxicos, radiaciones ionizantes que provocan roturas del ADN, exposiciones a luz ultravioleta, exposición a iones como el Zn^{2+} y Cd^{2+} . También se han observado que el daño puede ser espontáneo durante la replicación del material genético, una incorporación incorrecta de dNTPs o por la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Lindahl y Barnes, 2000). Los daños al material genético pueden ser letales para los organismos, por lo cual las células han creado sistemas de reparación, lo cual es crucial para la supervivencia (Martínez Espinosa *et.al.*, 2015). Las células presentan mecanismos de reparación como la recombinación no homóloga (RNH), la cual repara roturas de doble cadena utilizando una secuencia de ADN parecida a la dañada, pero puede provocar mutaciones o un reordenamiento cromosómico (Elodie Dardallic, *et.al.*, 2022). La recombinación de sitio específico (RSS) es un mecanismo de recombinación que implica secuencias específicas de recombinación, las cuales son reconocida por enzimas de tipo recombinasa que permite la integración de una sección de ADN específico en la secuencia genómica (Alberts *et.al.*, 2024). La trasposición es un proceso que permite la reparación del material moviendo de un lugar a otro un fragmento de genoma realizando así cambios estructurales y cambiando incluso la función del genoma, en un mecanismo importante para la evolución y modificación de ciertos genes (Donnell y Burns, 2010).

5. Recombinación homóloga

Las roturas de doble cadena del ADN (DSB por su nombre en inglés double strand break) se pueden originar por medio de fuentes exógenas como son radiación o quimioterapia o de fuentes endógenas como las ROS, o mecanismos estresantes al momento de la replicación o recombinación (Bonilla *et.al.*, 2020). Existen dos vías principales para la reparación de DSB, las cuales son la unión de extremos no homólogos (NHEJ por su nombre en inglés como non homologous end joining) el cual se realiza la unión directa de extremos rotos sin la necesidad de un ADN molde, el cual es un mecanismo más rápido que vuelve a unir los extremos el ADN, pero es más propenso a cometer errores al realizar la reparación; este mecanismo es activo durante el ciclo celular y en la reparación de material genético de eucariontes superiores. Los pasos secuenciales de esta vía son el reconocimiento de la rotura de ADN, el procesamiento de los extremos libres, la unión de estos extremos y la reparación del daño (Pannunzio, *et.al.*, 2018).

Mientras que la otra vía para la reparación de las DSB es la recombinación homóloga (HR), el cual es un mecanismo de reparación que permite acceder y copiar el material genético de una cadena de ADN intacta en *trans* para reparar las roturas de DSB (Haber, 1999) usando secuencias específicas como “plantilla” para la reparación del ADN dañado. Entre los pasos para realizar esto se encuentran los complejos MRN que reconocen y se unen a las DSB, permitiendo reconocer el corte en el ADN monocatenario (ADNss). Posteriormente la reparación se realiza con la unión de exonucleasas (EXO1) (Symington, 2014) y mediante la ayuda de proteínas de replicación (RPA) que evitará la formación de las estructuras secundarias o la misma degradación del ADNss (Her y Bunting, 2018). Posteriormente, la proteína RAD51 desplaza a las proteínas RPA para crear los elementos filamentos de nucleoproteínas con el ADNss, siendo este paso es uno de los más regulados en humanos para evitar errores o crear una recombinación no programada o deseada, RAD1 actúa en conjunto con otras proteínas como BRCA o sus parálogos (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 y SWSAP1) (Bonilla *et.al.*, 2020). RAD51 se une a la región homóloga a reparar que a su vez formará el bucle de desplazamiento (bucle D), donde se llevará a cabo la recombinación (Pannunzio, Watanabe y Lieber, 2018) (Figura 5).

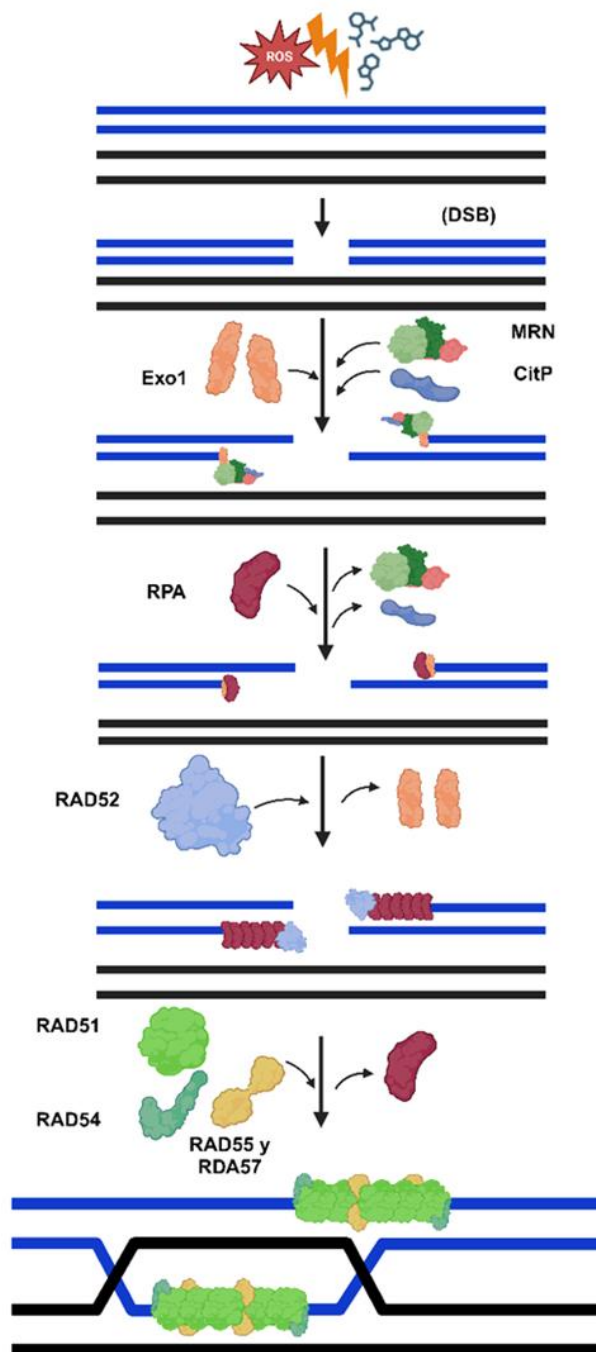


Figura 6: Recombinación homóloga mediante un daño endógeno o exógeno en donde se observa una ruptura de doble hebra (DSB) en la cual existe un fragmento del material genético dañado, teniendo una respuesta en la integración de proteínas encargadas en la reparación, como exonucleasas, complejos que procesan los extremos libres como MRN, proteínas de replicación A, así como homólogos de RAD51 que son mediadores y estabilizadores de la formación del filamento que se crea a partir de RAD51 (Flores Vega, *et.al.*, 2024).

Estudios realizados *in vitro* han propuesto que tanto la recombinasa RAD51 como la recombinasa DMC1 están presentes en los extremos DSB para la búsqueda de la plantilla del material genético con extremos 3' siendo un paso crucial en donde se necesita ambas proteínas (Scott Brown y Bishop, 2014). Se ha propuesto que ambas proteínas tienen un ancestro en común con la proteína RacA. RAD51 y DMC1 también han sido propuestos como reguladores que controlan el ensamblaje o desensamblaje de proteínas las cuales regulan positivamente a las proteínas RPA recubriendo el ssADN, dando una estabilización estructural para la formación de filamento durante la reparación del material dañado (Fujita y Shinohara 2024).

6. Recombinasa DMC1

DMC1 es una proteína que tiene ortólogos en proteínas de animales, plantas, protistas y levaduras siendo *Saccharomyces cerevisiae* donde se aisló por primera vez. DMC1 es importante en procesos de meiosis teniendo un papel en el intercambio de cadenas (Bishop *et.al.*, 1992). Esta proteína requiere de Mei5-Sae3 para la unión a ssAND (Hayase *et.al.*, 2004). En los organismos donde más se ha estudiado esta proteína son en las levaduras en donde para la recombinación se necesita una ATPasa, Rdh54/Tid parólogo de la familia de RAD51 (Holzen *et.al.*, 2006).

Estudios *in vitro* han demostrado que *DMC1* puede ser susceptible a la inhibición a través de procesos de ubiquitinación o degradación por el proteasoma, también se ha demostrado que los núcleos filamentos formados por la proteína DMC1 son menos estables que los formados por la proteína RAD51, debido a que su tasa de nucleación es más lenta a causa de su baja afinidad al ADN de cadena sencilla (Rao *et.al.*, 2017). A su vez, mutaciones o una desactivación en el gen *dmc1* pueden provocar esterilidad en ratones (Pittman *et.al.*, 1998).

7. Recombinasa RAD51

La proteína recombinasa RAD51 es la encargada de unir mediante el uso de nucleoproteínas el ADN molde con la DBS (Bonilla *et.al.*, 2020). RAD51 contiene como dominio central una ATPasa α/β , el cual contiene dos motivos llamados Walker A (GXXXXGKT/S) y un motivo Walker B (R/K-XXX-G-XXX-LhhhD). También contiene loop's los cuales son regiones claves para la interacción entre proteína y el ADN durante la recombinación homóloga (Short *et.al.*, 2016), los cuales tiene una función importante para la unión y a su vez la hidrólisis del ATP, otorgando la función de ATPasa. RAD51 es considerada una ATPasa débil en comparación con RecA que tiene una actividad mayor (entre 150 y 200 veces más). RAD51 se une a tres a ocho nucleótidos del ADN lo que le da la ventaja de tener múltiples sitios de unión a ADNss (Tomblin y Fishel, 2002) (Figura 6).

7.1 Mediadores y parálogos de RAD51

RAD51 tiene varios mediadores en vertebrados, entre los principales se encuentra BRCA2, el cual es necesario para el reclutamiento de RAD51 hacia el ADNss. BRCA2 inhibe a la ATPasa de la proteína RAD51 para tener una mayor afinidad al ADNss. Otros de los mediadores son los parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 y XRCC3) y un complejo llamado Shu (SWSAP1) (Sullivan y Bernstein, 2018).

Los parálogos de RAD51 son conocidos como mediadores conservados en las funciones como reparación, meiosis o en la misma DSB. Se ha observado que estos parálogos están presentes en levaduras como *S. cerevisiae* (scRAD51) y que comparten funciones similares, pero tiene una secuencia y estructuras de regulación e interacción diferentes, especializadas para cada organismo. También se han encontrado parálogos en *Caenorhabditis elegans* (ceRAD51) donde se ha descrito que participan en el intercambio de secuencias para la formación de bucles D (Taylor *et.al.*, 2015).

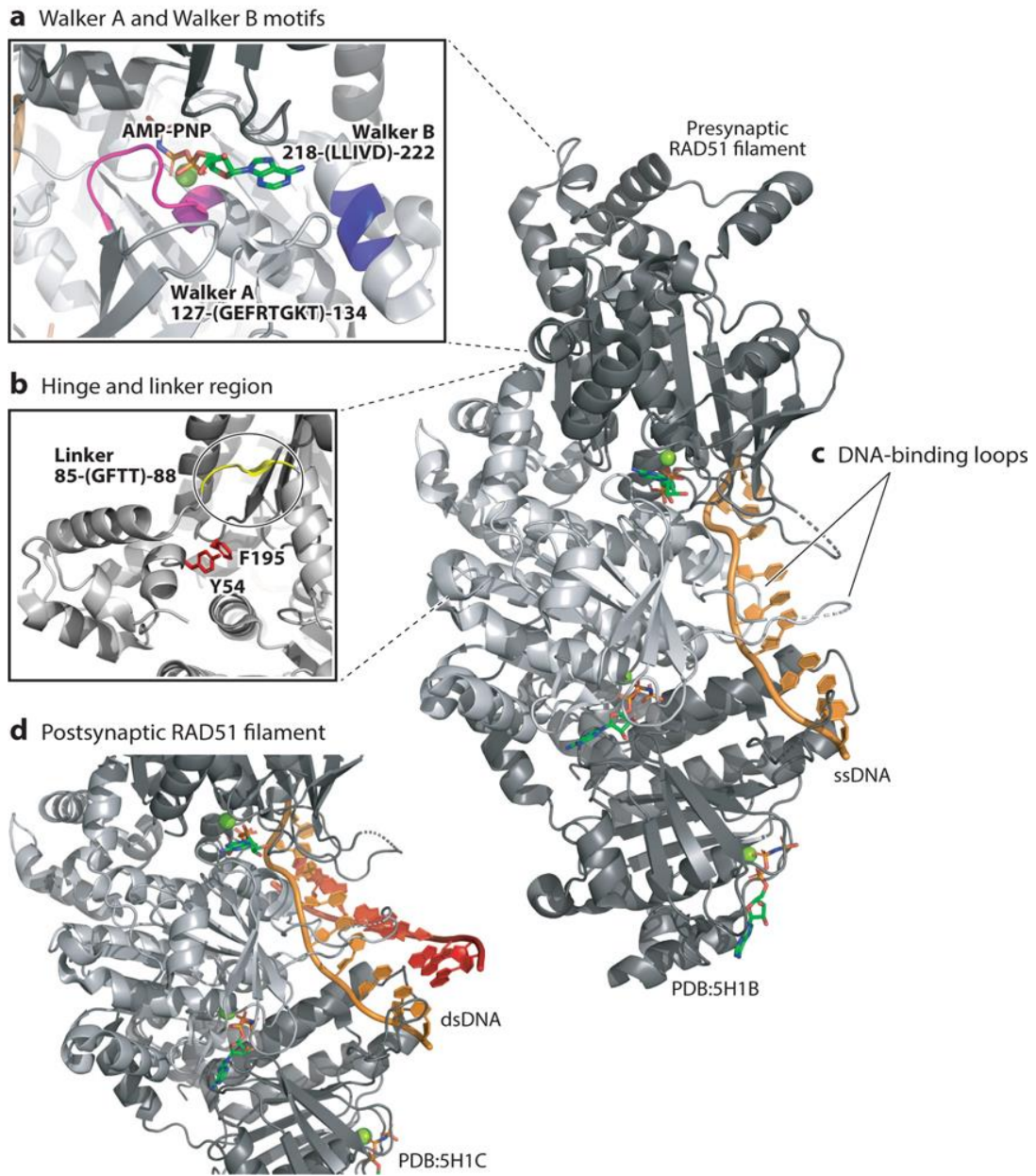


Figura 7: Vista estructural de los complejos de filamentos presinápticos y postsinápticos RAD51 en humanos. Protómeros mostrados en gris, lones de magnesio en verde, el ssADN y sdADN mostrado en naranja y rojo. **A)** Se muestran los motivos Walker A y Walker B. **B)** residuos clave para la unión promotor-protomero. **C)** filamento de unión de proteína RAD51 con el DNA. **D)** Filamento pre sináptico de unión al DNA. (Bonilla *et.al.*, 2020).

Antecedentes generales

Los iones como el Zn^{2+} y Cd^{2+} tiene implicaciones directas de daño del material genético (Ho, 2022). El Cd^{2+} es un metal tóxico, establecido como un contaminante global que se encuentra presente en el ambiente, plásticos, agua potable y fertilizantes utilizados en la agricultura. En estudios realizados en India a un grupo de personas expuestas a Cd^{2+} se determinó que en la mayoría de los casos se presentan aberraciones en los cromosomas que van desde intercambio cromosómico, cromatina condensada, también presentar un núcleo lobulado y daño oxidativo directo al ADN (Wikoff, *et.al.*, 2022).

Tratamientos con Cd^{2+} pueden producir toxicidad en la línea celular BEAS-2B en las que una sobre exposición al ion causa estrés oxidativo y activación de vías de señalización como las son la de JNK (observada en muerte celular) y ERK/MAPK (vista en la supervivencia celular). (Cao *et.al.*, 2021). Estudios realizados en población de países con un elevado índice de contaminación, muestran que las personas de ciudades desarrolladas presentan más daño de su material genético en comparación con personas que habitan zonas rurales (Rashid *et.al.*, 2018).

En plantas, la exposición con cadmio desencadena una respuesta al daño del ADN y el reclutamiento de proteínas que participan en vías de señalización, reconocimiento del daño del material genético, así como el reclutamiento de los factores de reparación del ADN (Wang *et.al.*, 2020).

El Zn^{2+} es un metal importante en funciones catalíticas, reguladoras o estructurales, y está implicado directa o indirectamente en el correcto funcionamiento de algunas enzimas, así como en el funcionamiento del sistema nervioso (Takeda, 2000). También forma parte de los dominios de dedos de zinc, importante en la transcripción o la síntesis de proteínas. Una concentración mayor a 9 mg/L de Zn^{2+} puede provocar apoptosis en el organismo (Augustyniak *et.al.*, 2008).

Ensayos de cometa han demostrado que células eucariotas expuestas a condiciones altas de metales Zn^{2+} y Cd^{2+} presentan un daño significativo en el material genético y se considera factores mutagénicos (Singh, *et.al.*, 200).

El Zn^{2+} participa en la regulación de ciertos procesos como lo son la apoptosis o incluso en el mismo ciclo celular (Truong Tran *et.al.*, 2001) y en procesos como la autofagia en determinadas células, como las de cáncer de mama, hematoma humano, o en las neuronas y los niveles de dopamina (Hung, *et.al*, 2013).

Estudios en ratones tratados con nanopartículas acopladas con Zn^{2+} reportaron que existe una citotoxicidad tiempo dependiente, con inducción de apoptosis desencadenada por daño al ADN y un aumento en las ROS, en la cual se comprobó la participación de RAD51. Además, se presentaron alteraciones en la espermatogénesis y daños en la fertilidad de los ratones machos (Han *et.al.*, 2016).

El tamaño del genoma sumado a las dificultades asociadas en la replicación determina la importancia de RAD51. De hecho, el metabolismo del ADN en sí mismo puede dar lugar a DSB cuando la hélice bicatenaria estable se desenrolla temporalmente y se vuelve vulnerable al ataque nucleófilico. En particular, las condiciones de estrés de replicación, en las que se ralentiza o se detiene, pueden hacer que el ADN se encuentre en este estado vulnerable y, por lo tanto, representar una fuente endógena importante de DSB. Como ejemplo, los vertebrados tienen un mayor estrés de replicación debido al mayor tamaño y complejidad del genoma en comparación con la levadura, de modo que la importancia de RAD51 para la supervivencia celular puede reflejar un nivel elevado de DSB endógenos (Wassing y Esashi, 2021).

RAD51 se ha estudiado ampliamente en la reparación de DSB de dos extremos, se ha estudiado *in vivo* cuya eficiencia se evalúa mediante ensayos funcionales que supervisan la reparación de DSB inducidos enzimáticamente en genes informadores. Se encuentra ampliamente a lo largo de la evolución, pero tiene variabilidad de supervivencia entre especies se ha observado que la eliminación de homólogos de RAD51 en levaduras *S. cerevisiae* o en levaduras de fisión confiere una alta sensibilidad a la radiación, pero no es perjudicial para la viabilidad celular, lo que sugiere que la importancia de que los homólogos son específicos para la reparación de DSB (Wassing y Esashi, 2021).

Antecedentes particulares

La proteína RAD51 participa en eventos de recombinación, expresión en diferentes parásitos, especialmente en los protozoarios. Los Estudios sobre HR y la proteína RAD51 han ido en aumento en los últimos años, principalmente en parásitos protozoos. Actualmente, existen terapias que utilizan estímulos como radiaciones y quimioterapias para inducir un daño al ADN para provocar apoptosis en los protozoarios parásitos, lo que ha ocasionado que en algunos tengan una adaptación ambiental y tengan una mayor resistencia a fármacos, evasión del sistema inmune del hospedero y supervivencia (Deitsch *et.al.* 1997).

La proteína RAD51 en eucariotas tiene una organización molecular altamente conservada a lo largo de la evolución. Esta proteína incluye un dominio muy conservado que contiene dos motivos hélice-horquilla-hélice (HhH) en el extremo N-terminal, cuya función es importante en el reconocimiento y unión al ADN, puede interactuar con el ssADN o con el dsADN dando estabilidad al momento de la RH entre la unión proteína - ADN (Ogura *et al.*, 2001).

En contraste, en la proteína bacteriana RecA, el dominio HhH se localiza en el extremo C-terminal. RAD51 también posee un dominio ATPasa conservado que incluye los subdominios RECA_2 y RECA_3. El dominio RECA_2 que contiene los motivos Walker A y Walker B los cuales tienen función importante durante la hidrólisis de ATP, también un motivo loop1 que está relacionado con la unión al ssDNA facilitando la correcta alineación del ADN para el proceso de búsqueda de homología y el intercambio de cadenas (Shin, *et.al*, 2003).

El dominio RECA_3 conteniente el motivo loop2 que tiene una función de ayuda para que la proteína RAD51 o RecA extienda y establezca los filamentos sobre el ADN, lo que es esencial para los procesos de reparación del ADN (Figura 7). Los motivos y dominios de la proteína RAD51 de *T. vaginalis* (TvRAD51) comparte un dominio central conservado desde bacterias hasta el humano que consta de aproximadamente 230 aa y recibe el nombre de dominio RECA / DMC1/ RAD51 que se ha descrito como dominio ATPasa (Figura 8) (Sosa Mondragón, PCG, 2021).

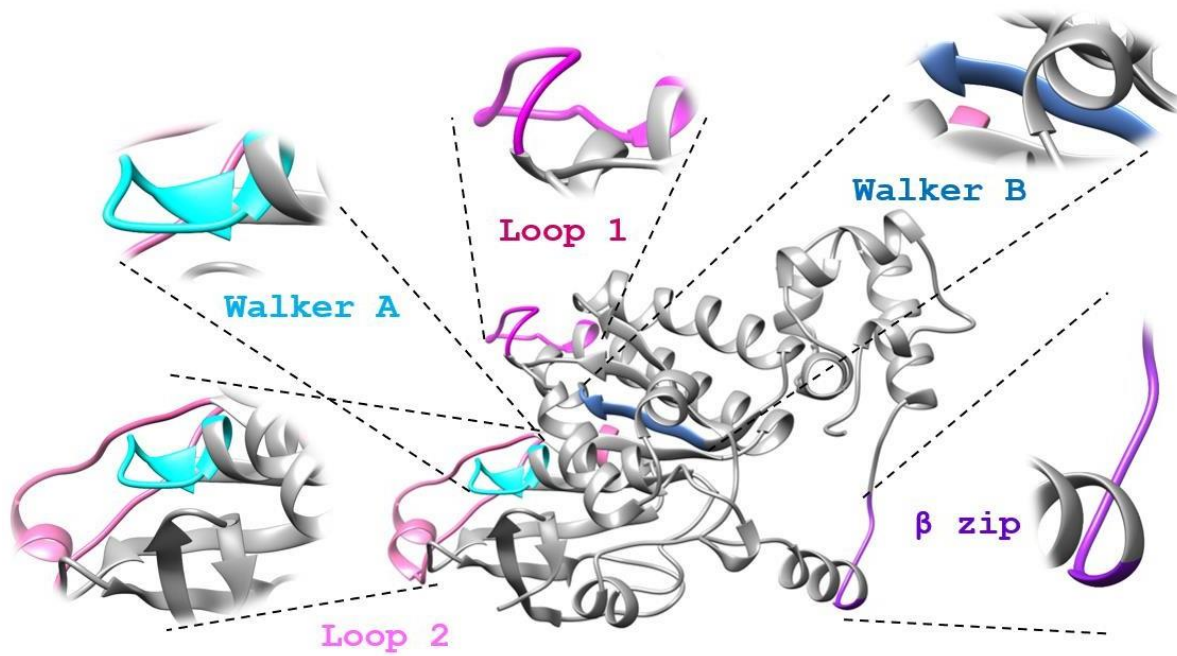


Figura 8: Proteína RAD51 con los diferentes motivos que presenta como los Walker A y Walker B. Los motivos Loop 1 y Loop 2 (Imagen obtenida de Sosa Mondragón, PCG, 2021)

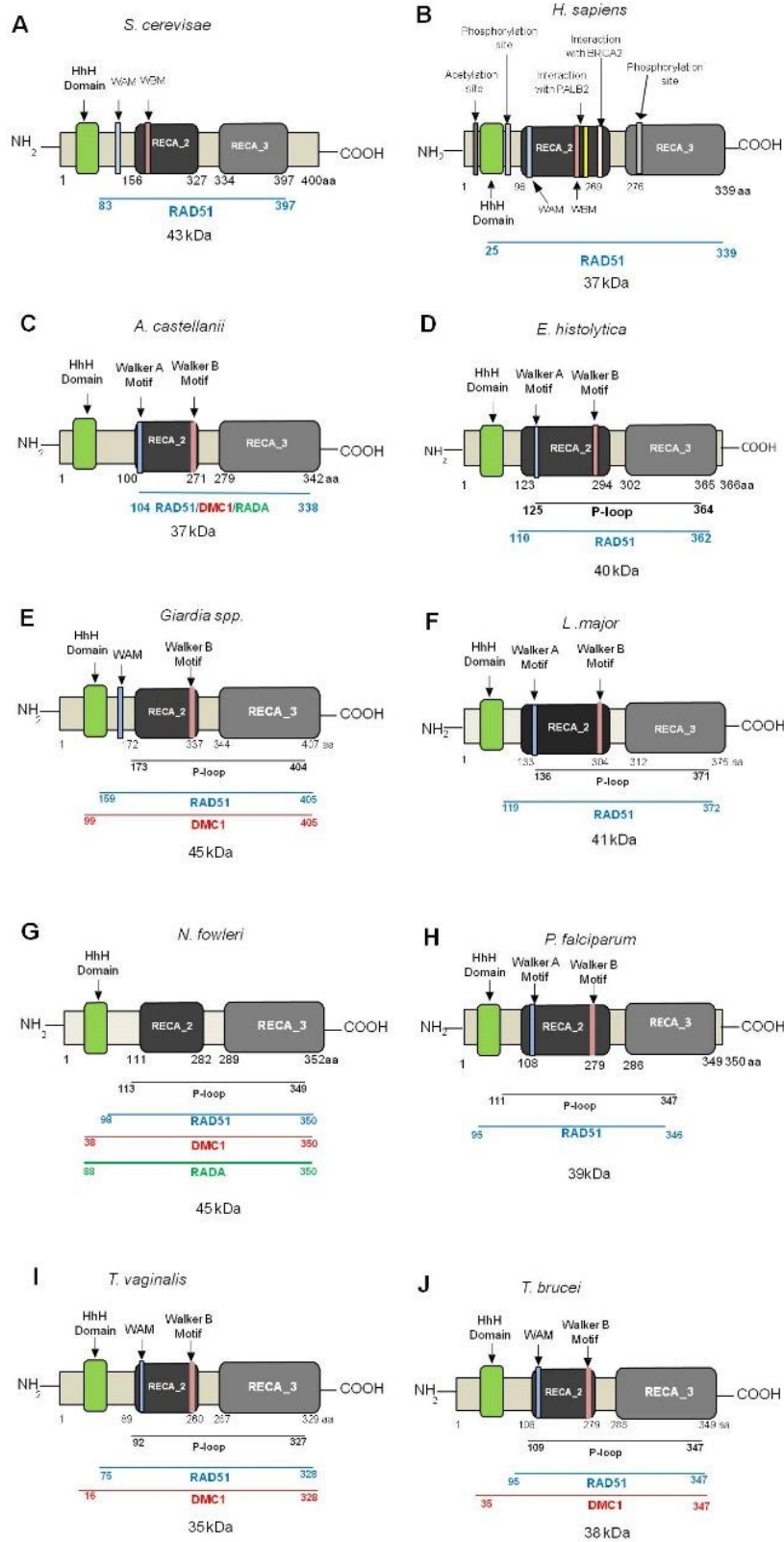


Figura 9: Análisis de los dominios (RECA, RECB) y motivos (Walker A y Walker B) que se comparten en levaduras, humano y parásitos protozoarios (Flores Vega, *et.al*, 2024).

RAD51 comparte muchos homólogos presentes en varios organismos protozoos. En el parásito *Leishmania spp* se ha descrito a LmRAD51, la cual se une al ADN, tiene una actividad de ATPasa dependiente de ADN y participa en la inactivación de algunos genes ocasionando resistencia a algunos fármacos (Kean *et. al*, 2001).

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas contiene el gen de RAD51 (Tc-rda51) el cual tiene un papel importante en la reparación del daño de material genético inducido por una radiación ionizante (Conway *et.al*, 2002).

En *E. histolytica*, la proteína RAD51 (EhRAD51) ha sido implicada en la reparación de ADN cuando el parásito enfrenta daño genotóxico. Las condiciones hostiles donde se presenta el parásito, como el intestino humano, es esencial la función de RAD51 para reparar el daño generado o particularmente en momentos de estrés ambiental, también puede presentar un papel importante en la supervivencia y en la virulencia del parásito al contribuir a la estabilidad de su genoma (González *et al*. 2016).

G. lamblia, es el agente causal de giardiasis, tiene un genoma compacto y en el cual mecanismos de reparación son demasiado eficientes y esenciales para su supervivencia, por eso la importancia de proteínas de reparación como RAD51 son esenciales para cuando el parásito enfrenta condiciones de estrés oxidativo o daño inducido por el sistema inmune del hospedero (Bernstein *et al*. 2015).

En *T. brucei*, el cual es el agente causante de la llamada enfermedad del sueño, la proteína RAD51 tiene un papel más complejo. Este parásito al presentar variaciones antigénicas el cual es un mecanismo de cambio de sus proteínas de superficie para evadir la respuesta inmune del hospedero. RAD51 es crucial en este proceso porque facilita la recombinación homóloga entre genes de superficie, permitiendo al parásito alterar su expresión antigénica. También, RAD51 se ve implicado en la reparación del ADN durante la fase replicativa del ciclo celular, siendo esencial para la supervivencia del parásito en el torrente sanguíneo (Figura 9) (Glover *et al*. 2008).

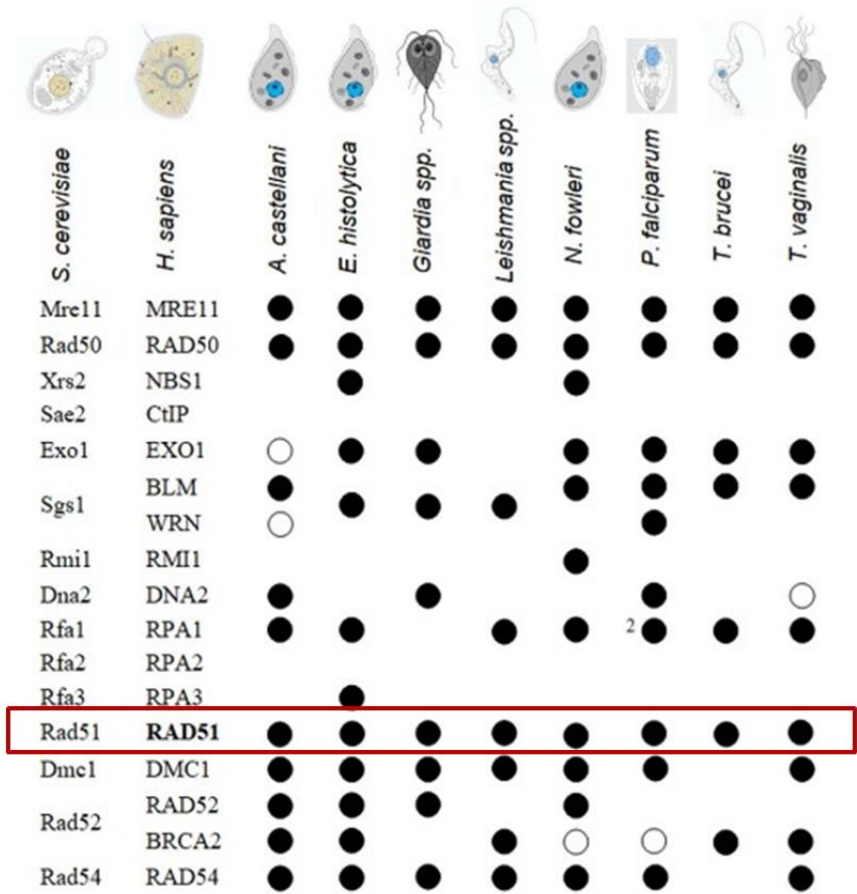


Figura 10: Ilustración de proteínas encontradas en RH en diferentes organismos vivos, donde RAD51 es una proteína que se encuentra siempre presente en estos procesos (Flores Vega, *et.al*, 2024).

RAD51 ha sido ampliamente estudiada por su papel central en los mecanismos de reparación del ADN en eucariontes multicelulares y unicelulares, incluyendo los protozoarios parásitos, lo que la convierte en un objetivo farmacológico de gran interés ya que varios de estos dependen de estos mecanismos para su supervivencia. (Kelso, *et.al*, 2016).

Justificación

Trichomonas vaginalis infecta al tracto urogenital masculino en el cual se encuentran diversos cationes como el Zn^{2+} y el Cd^{2+} , que modulan diversos factores de virulencia en el parásito, pero también podrían dañar el material genético del parásito activando mecanismo de reparación como la recombinación homóloga.

TvRAD51 es una proteína clave en el mecanismo de reparación del ADN del parásito por lo que estudiar su expresión en condiciones de Zn^{2+} y Cd^{2+} nos brindara información sobre este mecanismo de reparación durante la tricomoniasis masculina.

Hipótesis

Los cationes metálicos presentes en el microambiente urogenital masculino como Zn^{2+} y Cd^{2+} modularán diferencialmente de manera positiva la expresión de la proteína TvRAD51 como un mecanismo de respuesta al daño del ADN.

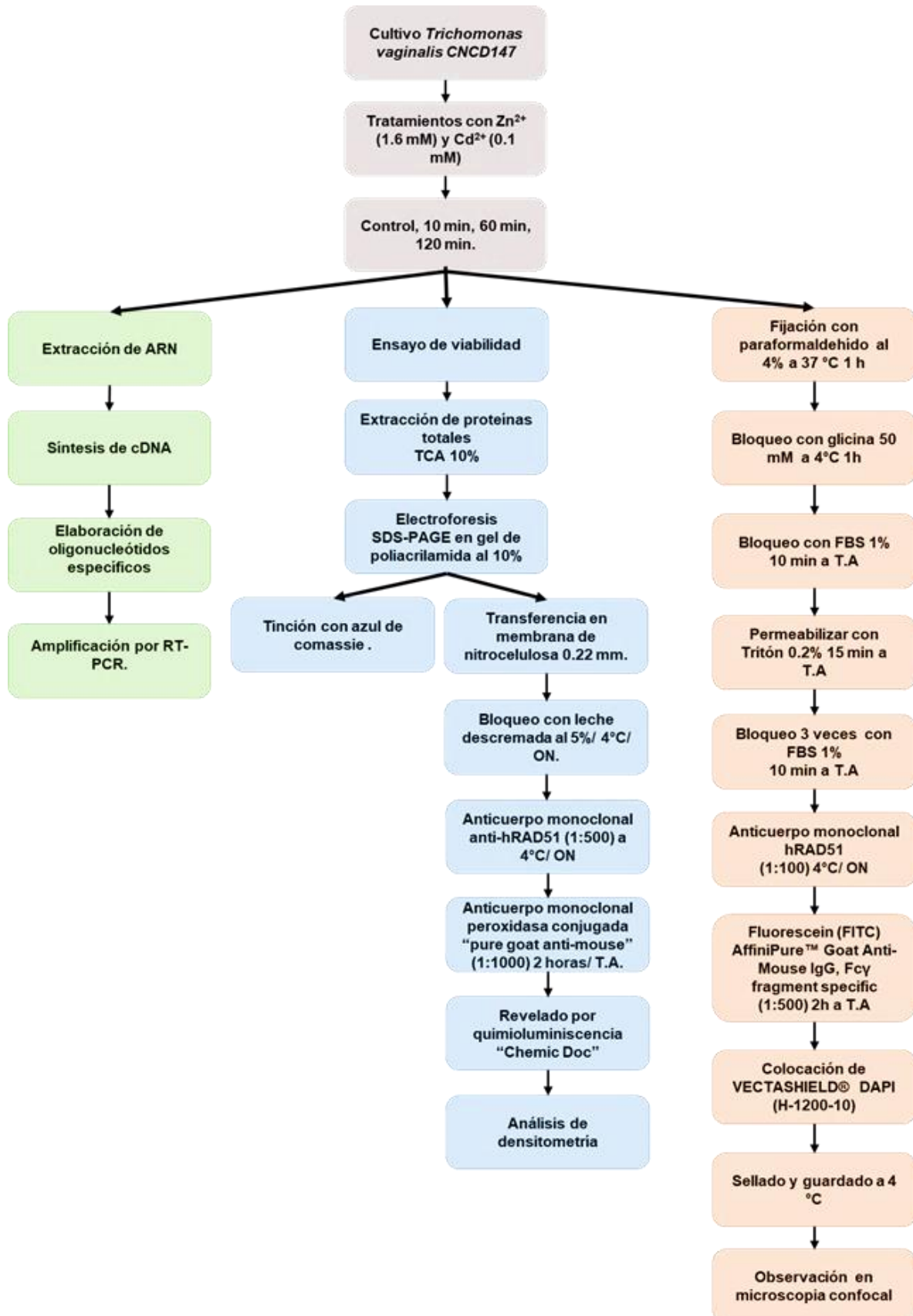
Objetivo general

Estudiar la expresión de la proteína TvRAD51 de *Trichomonas vaginalis* en el ambiente de la tricomoniasis masculina en presencia de Zn^{2+} y Cd^{2+} .

Objetivos específicos

1. Analizar la expresión de gen *tvrad51* después del tratamiento con los iones metálicos Zn^{2+} y Cd^{2+} .
2. Evaluar la expresión de TvRAD51 en presencia de Zn^{2+} y Cd^{2+}
3. Inmunolocalizar a TvRAD51 en *Trichomonas vaginalis* expuestas a Zn^{2+} y Cd^{2+}

Estrategia experimental



Material y método

Western blot

Cultivos de *T. vaginalis* tratados con los cationes Zn^{2+} (1.6 mM) Cd^{2+} (0.1 mM) por 10 minutos, 60 minutos y 120 minutos. Como control se utilizaron parásitos en un cultivo sin ningún tratamiento con cationes. Se resuspendieron 1×10^6 parásitos en PBS 1X, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm 5 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en PBS 1x y se les agregó ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final de 10 % y se incubó 1 h a -70°C. Para la extracción de proteínas totales la muestra se centrifugó y se hicieron cinco lavados con PBS 1X -acetona 1%. Posteriormente la pastilla se le adicionó amortiguador de carga de proteínas 2X, se hirvió por cinco minutos y se centrifugó a 13,000 rpm 5 minutos a 4°C. Se cargaron 200 μ L de proteína total cuantificada por espectrofotometría 260/280 en 15 μ L por pocillo en un gel de acrilamida al 10 % y se realizó una electroforesis SDS-PAGE a 80 volts. Pasando el tiempo de electroforesis se realizó una transferencia a membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m en una cámara semihúmeda a 20 volts durante 20 minutos. Posteriormente la membrana transferida se bloqueó con leche descremada al 5% disuelta en PBS 1X pH7 durante 12 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron cinco lavados con PBS-Tween al 1 % y se adicionó el anticuerpo primario anti-RAD51 de humano (3CS10) sc-53428 que reconoce la proteína RAD51 en humanos, en una dilución 1:500 12 horas a 4°C en agitación. Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (pure goat anti-mouse IgG-115-035-062, Jackson) que reconoce las inmunoglobulinas G de ratón en una dilución 1:3000 a temperatura ambiente por 2 horas cubierto de la luz.

Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween y se reveló por quimioluminiscencia con luminol (Thermo) y se realizó un análisis de densitometría a partir de la intensidad de píxeles. Como control de carga y normalizador para ambas condiciones, se utilizó un anticuerpo anti β -tubulina. Este control permitió asegurar que las variaciones observadas en la expresión de TvRAD51 no fueron debidas a diferencias en la carga de proteínas o en la transferencia de Western Blot.

Inmunofluorescencia indirecta

Se utilizó para llevar a cabo inmunofluorescencia el cultivo de *T. vaginalis* con tratamiento de Zn^{2+} (1.6 mM) y Cd^{2+} (0.1 mM) en los tiempos de 10 minutos, 60 minutos, 120 minutos. Como control se utilizaron parásitos en un cultivo sin ningún tratamiento con cationes. El parásito se fijó sobre una laminilla con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a 37 °C cubierto de la luz. Se adiciono glicina 50mM en PBS pH7 una hora a 4°C y suero fetal bovino al 1% 10 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizó con tritón x100 15 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó nuevamente con suero fetal bovino al 1% 3 veces durante 5 minutos a 4°C. Se adicionó el anticuerpo primario anti-RAD51h en una dilución 1:100 12 horas a 4°C sin agitación. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X pH7. Las laminillas se incubaron el anticuerpo secundario cabra anti ratón acoplado a FITC (115-095-071) en una dilución 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente cubierto de la luz. Se adicionaron 2 µL de Vecta Shield - DAPI para teñir núcleos Las muestras se observaron en un microscopio confocal usando los siguientes parámetros para FITC: línea de laser: 488, set de filtro común: 530/30, absorción: 498 nm, emisión: 517 nm y para Vecta Shield – DAPI línea laser: 358 nm, set de filtro común 340/380 nm, absorción 358 nm, emisión 461 nm .

Ensayo de viabilidad por azul de Tripano

El aislado de CNCD147 de *T. vaginalis* se cultivó en medio TYM (triptocaseina extracto de levadura-maltosa) por 24 horas a 37°C adicionado con 10% de suero de caballo inactivado por calor. Se realizó un conteo de parásitos y se obtuvo una colonia de 20×10^6 . Los cultivos fueron tratados con lo cationes Zn^{2+} (1.6 mM) Cd^{2+} (0.1 mM) por 10 minutos, 60 minutos y 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos y un control sin tratamiento.

Posteriormente después de cada tiempo de cada cultivo se obtuvo una muestra para agregar en partes iguales (1:1) el azul de tripano (0.4% Corning Cellgro), para posteriormente realizar el conteo de parásitos vivos y parásitos muertos que tendrán una coloración en azul.

Cultivo de *Trichomonas vaginalis* en presencia de iones metálicos

El aislado de CNCD147 de *T. vaginalis* se cultivó en medio TYM (triptocaseína extracto de levadura-maltosa) por 24 horas a 37°C adicionado con 10% de suero de caballo inactivado por calor. Se obtuvo una pastilla de 20×10^6 . Se realizaron tres lavados con PBS 1X (pH 7), con centrifugaciones de 1,800 rpm 5 minutos a 4°C entre cada lavado.

Extracción de ARN total

A partir de 2×10^6 parásitos que fueron crecidos en medio TYM suplementado con 1.6 mM de Zn^{2+} y 0.1 mM de Cd^{2+} en los tiempos de 10 minutos, 60 minutos y 120 minutos. Como control se utilizaron parásitos en un cultivo sin ningún tratamiento con cationes. Cada pastilla se centrifugó a 1800 rpm por 5 min y se lavó con 1 ml de PBS pH7 3 veces. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 1 ml de Trizol y se almacenó a -80°C.

Después se incubó por 30 minutos a 4°C hasta descongelar, se adicionó 200 μ l de cloroformo y se mezcló por 15 segundos a 4°C, se centrifugó a 10000 rpm por 15 min a 4°C y se la fase acuosa se recuperó y se pasó a un tubo nuevo estéril. Posteriormente a la fase acuosa se adicionó 500 μ l de isopropanol y se incubó durante 2 horas a -20°C. Después se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C y la pastilla se lavó dos veces con 600 μ l de etanol al 100%, se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 60 μ l de agua libre de RNAsas. Posteriormente al RNA se le dio tratamiento con DNAsa 37°C por 1 hora. Después se inactivó a 65°C por 10 min. El RNA se cuantificó y se midió la pureza por el NanoDrop 2000. La integridad del RNA total se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Síntesis de cDNA

De 2-5 µg de RNA se cuantificaron y se incubó con 1 µl de DNAsa (1 unidad) durante 1 hora a 37°C. Se adicionó 1 µl de solución de paro para DNAsa y se incubó 10 min a 65°C. El tratamiento con DNAsa se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cuantificó el RNA tratado y se adicionó de 1-3 µg en un tubo nuevo, se adicionó 1 µl de Oligo DT y agua DEPC para un volumen final de 12 µl. se desnaturalizó por 15 min a 70°C, después el tubo se pasó al hielo durante 5 min y en el hielo se adicionó la siguiente mezcla:

- Buffer 10X 2 µl
- DTT [0.1 M] 2 µl
- dNTPs [10 Mm] 1 µl
- MgCl₂ [25 Mm] 2 µl

Se Incubó 2 minutos a 42°C y se adicionó 1 µl de RT (Retrotranscriptasa Reversa, Thermo Fisher), se incubó nuevamente 50 minutos a 42°C y se inactivó 10 minutos a 70°C. El producto se cuantificó en el Nano Drop 2000.

Amplificación por RT-PCR.

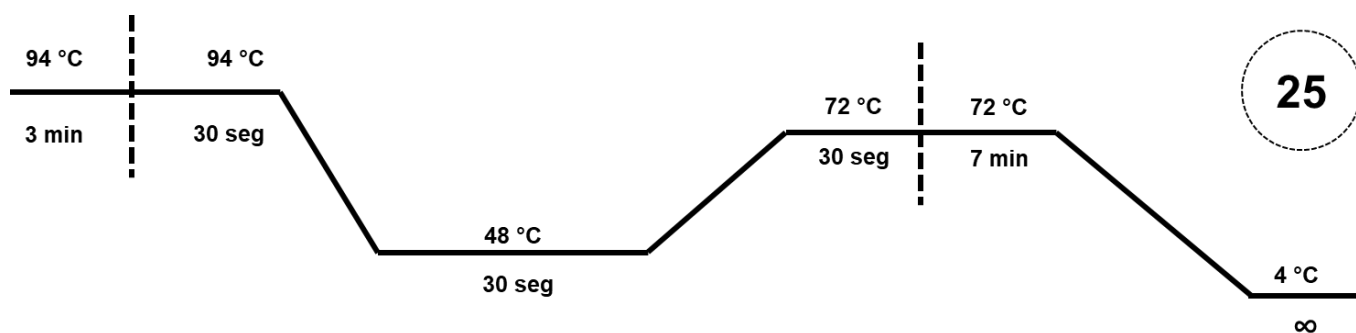
Los oligonucleótidos se diseñaron específicos para la secuencia de *tvrads1* a partir de cDNA se realizó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para un volumen final de 25 μ l con las siguientes condiciones:

- Buffer PCR 10x 5 μ l
- MgCl₂ [25 Mm] 3 μ l
- H₂O DEPC 36.5 μ l
- dNTP mix [10 mM] 1 μ l
- Primer F-RT-*rad51* 1 μ l
- Primer R-RT-*rad51* 1 μ l
- cDNA 2 μ l
- Taq polimerasa 0.5 μ l

Los oligonucleótidos específicos son:

Sentido	5' TGG CAA CAA CTC AGT CG 3'
TM	49
Anti-sentido	5'CGC AAG CTG CAC AAT AC 3'
TM	49

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

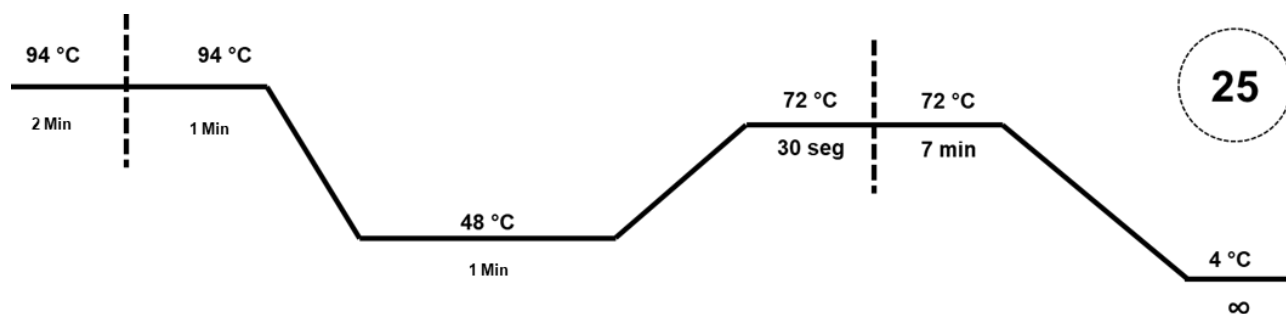


Para la amplificación del gen β *tubulina* como control de carga para todos los genes que se amplificaron. Se utilizaron los siguientes iniciadores:

Sentido	TUB9 5' CAT TGA TAA CGA AGC TCC TTT ACG AT 3'
TM	68
Anti-sentido	TUB3 5' GCA TGT TGT GCC GGA CAT AAC CAT 3'
TM	68

- Buffer PCR 10x 5 μ l
- MgCl₂ [25 Mm] 3 μ l
- H₂O DEPC 36.5 μ l
- dNTP mix [10 mM] 1 μ l
- Primer TUB3 1 μ l
- Primer TUB9 1 μ l
- cDNA 2 μ l
- Taq polimerasa 0.5 μ l

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:



8. Resultados

8.1 Análisis de expresión de *tvrad51* de *T. vaginalis*.

A partir del RNA total obtenido del cultivo de parásitos con medio suplementado con Zn^{2+} (1.6 mM) y Cd^{2+} (0.1 mM) y un control, se realizó la cuantificación para llevar a cabo la RT-PCR utilizando 2 μ g de RNA para la síntesis del cDNA, para la posterior amplificación del gen *tvrad51* con los oligonucleótidos diseñados específicamente, usando 100 ng de cDNA como templado, amplificando un fragmento de 104 pb. Como control de carga se utilizó el amplificado del gen de β -tubulina (112 pb). El análisis densitométrico del experimento se realizó midiendo la densidad de las bandas del gel de agarosa obtenido después de la amplificación. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias se determinaron mediante análisis de varianza (Fig 11 y 12)

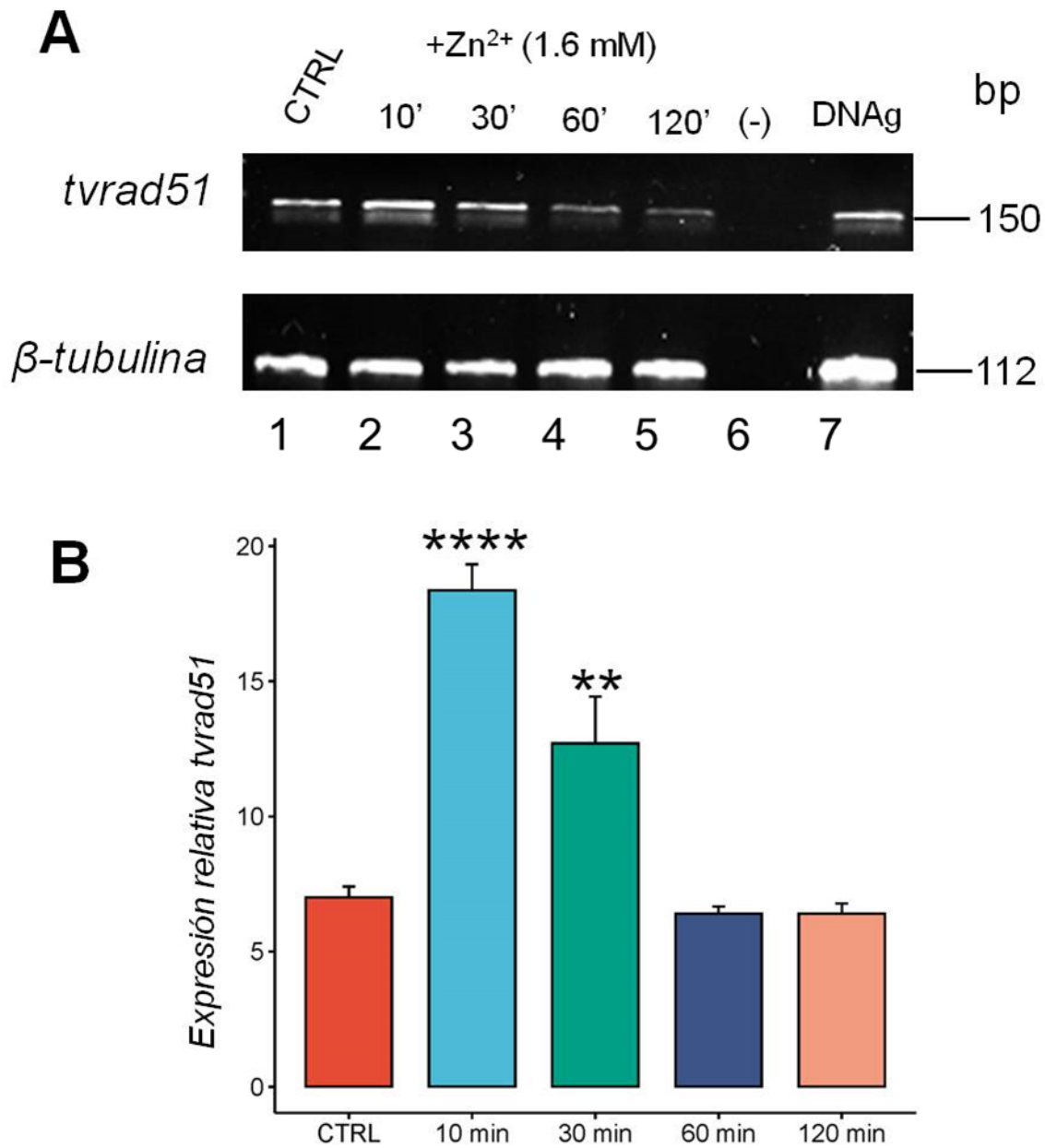


Figura 11. Expresión del gen *tvrad51* en *T. vaginalis* en condiciones de Zn²⁺.

(A) Productos de PCR correspondientes al gen *tvrad51* de *T. vaginalis*, tratados con 1.6 mM de Zn²⁺ en condiciones normales (CTRL) carril 1, 10 minutos (carril 2), 30 minutos (carril 3), 60 minutos (carril 4) y 120 minutos (carril 5). Se utilizó ADN genómico (ADNg) de *T. vaginalis* como control de amplificación (Carril 6) con los tamaños de 150 pb carril 1). Se utilizó la amplificación específica del fragmento de la β -tubulina (112 pb) como normalizador.

(B). El experimento se realizó por triplicado y se determinó la significancia estadística por prueba de ANOVA y post hoc (tukey) comparando las desviaciones estándar de cada condición. $p < 0.001$ se consideró estadísticamente significativo (***).

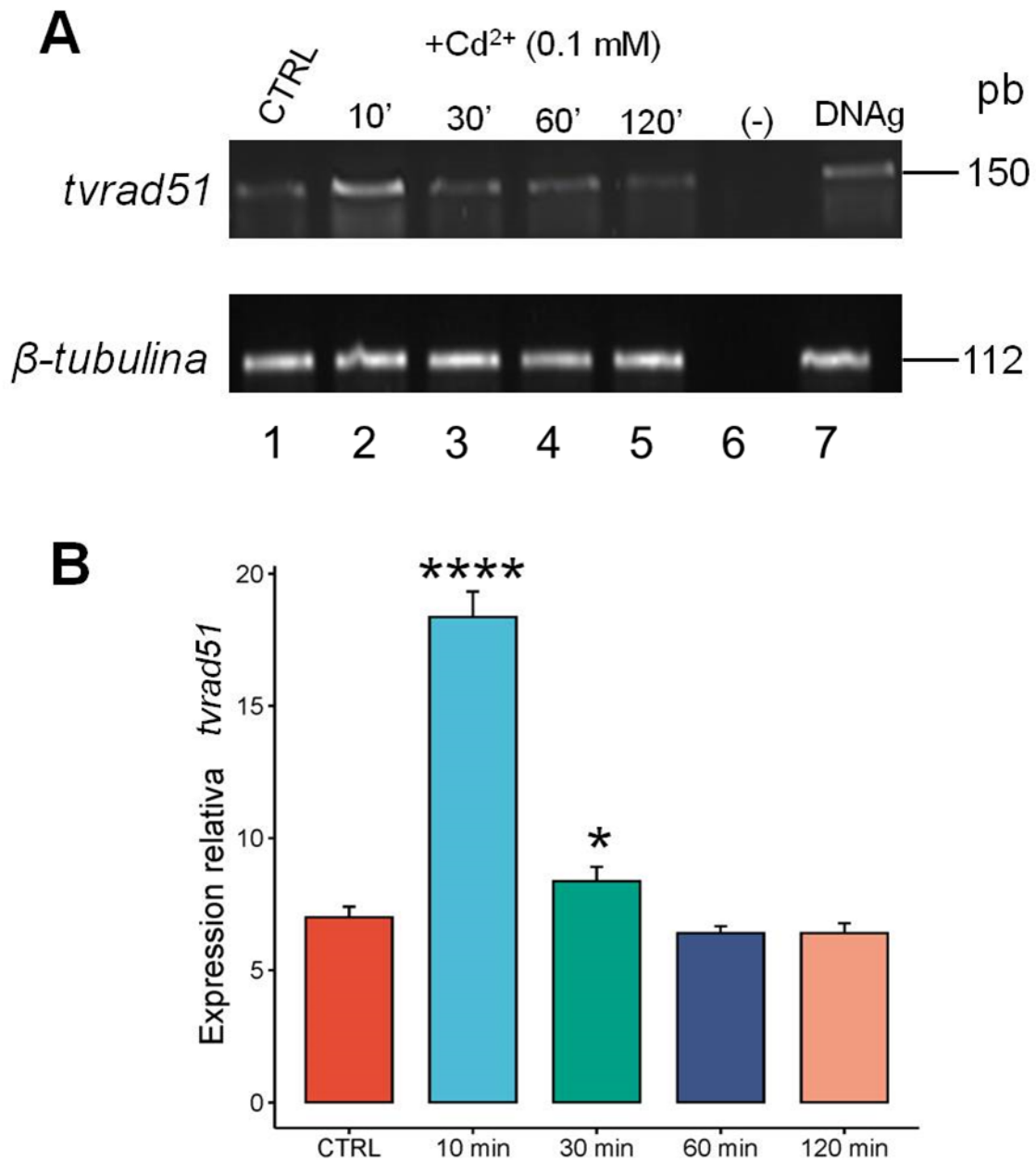


Figura 12: Expresión del gen *tvrad51* en *T. vaginalis* en condiciones de Cd²⁺

(A) Productos de PCR correspondientes al gen *tvrad51* de *T. vaginalis*, tratados con 0.1 mM de Cd²⁺ en condiciones normales (CTRL) carril 1, 10 minutos (carril 2), 30 minutos (carril 3). 60 minutos (carril 4) y 120 minutos (carril 4). Se utilizó ADN genómico (gDNA) de *T. vaginalis* como control de amplificación (Carril 6) con los tamaños de 150 pb carril 1). Se utilizó la amplificación específica del fragmento de la beta tubulina (112 pb) como normalizador.

(B). El experimento se realizó por triplicado y se determinó la significancia estadística por prueba de ANOVA y post hoc (tukey) comparando las desviaciones estándar de cada condición. $p < 0.001$

8.2 Ensayo de viabilidad

Para determinar el efecto de las concentraciones empleadas de los cationes sobre la viabilidad de *T. vaginalis*, se realizó un ensayo de viabilidad a partir de un cultivo de CNCD147 en medio TYM acondicionado con suero de caballo, con los tratamientos de los cationes de Zn^{2+} a una concentración de 1.6 mM y 0.1 mM de Cd^{2+} respectivamente a los tiempos de 10 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos y 240 minutos. Se observó que los parásitos mantienen su viabilidad a las concentraciones utilizadas de los cationes, a los 60-120 minutos de tratamiento la viabilidad baja hasta un 98%, no obstante, se observa un patrón similar incluso en la condición sin tratamiento (CTRL) en los tiempos de 60 a 120 minutos (Fig. 11A). A las concentraciones utilizadas de los cationes, estos no tienen un efecto citotóxico o sobre la morfología de los parásitos (Fig.13B).

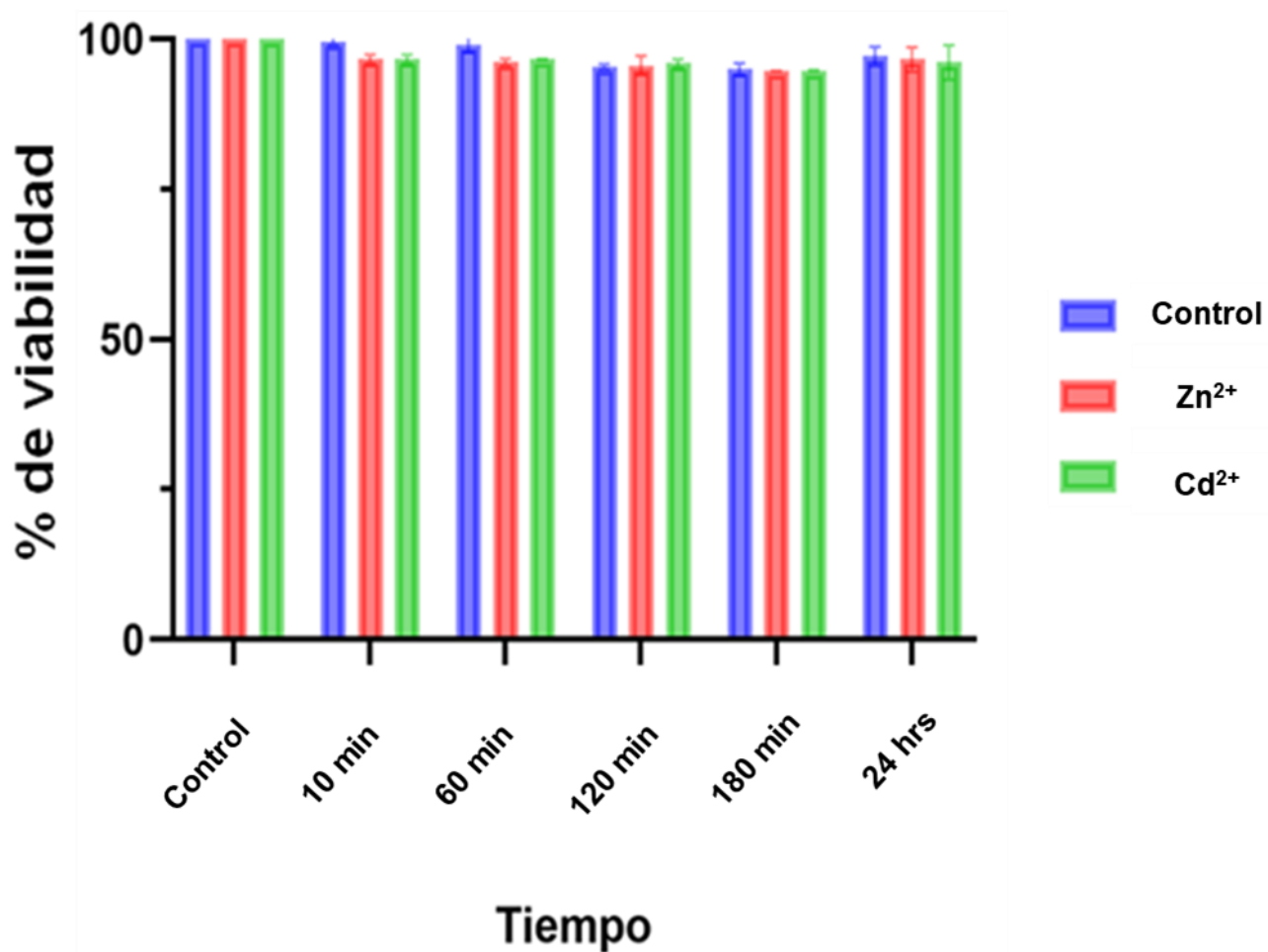


Figura 13: Análisis de viabilidad de *T. vaginalis* tratados con cationes.

(A) Análisis de viabilidad de *T. vaginalis* en las condiciones de Zn²⁺ a una concentración de 1.6 mM y Cd²⁺ a una concentración de 0.1 mM. Los tratamientos se realizaron en tiempos de 10 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas.

8.3 Cinética de expresión TvRAD51 en presencia de Zn²⁺ y Cd²⁺

Se analizó la expresión diferencial de la proteína *TvRAD51* en *T. vaginalis* del aislado *CNCD147*, en respuesta a la presencia de los cationes Zn²⁺ y Cd²⁺. Para esto, se cosecharon 20x10⁶ de parásitos tratados con Zn²⁺ a una concentración de 1.6 mM o Cd²⁺ a una concentración de 0.1 mM por 10 minutos, 60 minutos y 120 y los otros tiempos (resultado previo) minutos, además de un control sin tratamiento (Fig. 14).

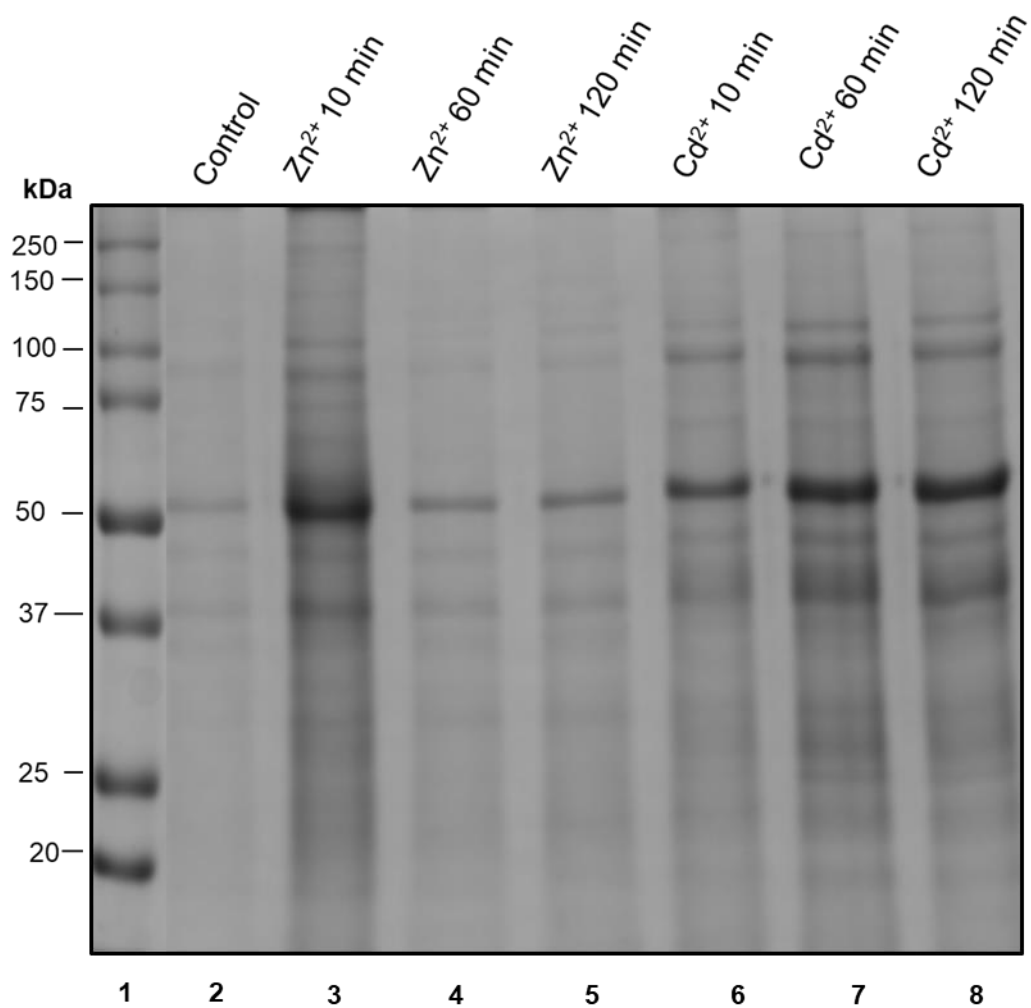


Figura 14: Perfil proteico de extractos de *T. vaginalis* tratados con diferentes concentraciones de cationes.

Perfil proteico de extractos de *T. vaginalis* con los tratamientos de Zn^{2+} en una concentración de 1.6 mM y Cd^{2+} a una concentración de 0.1 mM precipitados con TCA 10%. Carril 1. Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad). Carril 2. Perfil de extractos de *T. vaginalis* en condición control sin tratamiento de cationes (Control). Carril 3. Perfil de extractos de *T. vaginalis* con tratamiento con Zn^{2+} 10 minutos. Carril 4. Perfil de extractos de *T. vaginalis* Zn^{2+} 60 minutos. Carril 4. Tratamiento Zn^{2+} 120 minutos. Carril 6. Tratamiento con Cd^{2+} 10 minutos. Carril 7. Tratamiento con Cd^{2+} 60 minutos. Carril 8. Tratamiento con Cd^{2+} 120 minutos.

8.4 La inmunodetección de la proteína TvRAD51

La inmunodetección de la proteína TvRAD51 en extractos de *T. vaginalis* se realizó mediante Western Blot. La inmunodetección de la proteína se hizo usando los anticuerpos monoclonal ratón anti-hRAD51 dilución 1:1000, y el anticuerpo monoclonal secundario cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) dilución 1:3000, encontrando una banda de un peso molecular de 37 kDa la proteína RAD51.

La abundancia de TvRAD51 mostró un incremento significativo a los 60 minutos de tratamiento con Zn^{2+} , evidenciado por la presencia de la banda de 37 kDa en los extractos de parásitos con respecto a el CTRL (Fig. 15A). Los niveles de TvRAD51 disminuyeron posteriormente a los 120 minutos lo cual fue corroborado por análisis densimétricos de las bandas encontrando que a los 10 minutos de tratamiento se incrementa 0.6 la expresión relativa comparada con el control, siendo este tiempo el de mayor abundancia y estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.001$) (Fig. 15B).

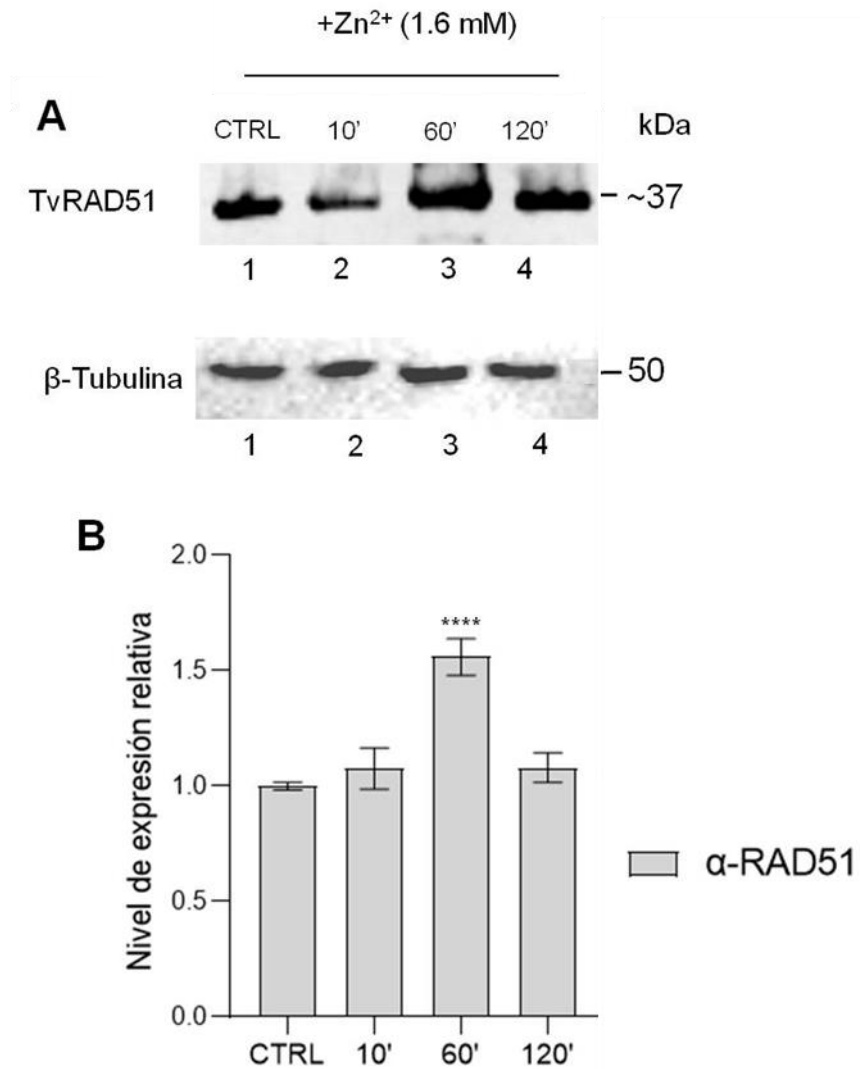


Figura 15: Abundancia de la proteína TvRAD51 en *T. vaginalis* con tratamientos de Zn²⁺

A) Banda de 37 kDa inmunoreconocida con los anticuerpos anti- hRAD51. Control de carga anti hβ-tubulina. En condiciones de Zn²⁺ concentración de 1.6 mM. Carril 1. Control. Carril 2. 10 minutos. Carril 3. 60 minutos. Carril 4. Tiempo de 120 minutos. Carril 5 24 horas. B) Análisis densitométrico de intensidad de pixeles de la expresión de TvRAD51. El experimento se realizó por triplicado y se determinó la significancia estadística por prueba de ANOVA y post hoc (tukey) comparando las desviaciones estándar de cada condición. $p < 0.001$ se consideró estadísticamente significativo (****).

8.5 Expresión de TvRAD51 en respuesta a Cd²⁺

Para evaluar la respuesta de *T. vaginalis* al cadmio (Cd²⁺), los parásitos fueron tratados con 0.1 mM de Cd²⁺ y se analizó la expresión de TvRAD51 en los extractos en los mismos intervalos de tiempo. Los resultados de WB mostraron un aumento en la abundancia de TvRAD51 a los 10 y 60 minutos de tratamiento con Cd²⁺. Sin embargo, la expresión de TvRAD51 disminuyó a los 120 (Fig.16A). Nuevamente los análisis densitométricos corroboraron esta expresión indicando que a los 10 minutos hay 0.3 mayor expresión comparada con el control, y a los 60 minutos 0.8 mayor expresión teniendo una diferencia significativa ($p < 0.001$) (Fig. 16B).

Los resultados indican que la expresión de la proteína TvRAD51 de *T. vaginalis* es modulada por el tratamiento con Zn²⁺ y Cd²⁺ de manera dependiente del tiempo. El Zn²⁺ induce una mayor abundancia de RAD51 a los 60 minutos, mientras que el Cd²⁺ provocó un aumento temprano en la expresión a los 10 y 60 minutos, seguido de una disminución en tiempos posteriores. Estos hallazgos sugieren una posible regulación diferencial de la expresión de TvRAD51 en respuesta a diferentes metales pesados, lo cual podría tener implicaciones en los mecanismos de reparación del ADN y en la adaptación del parásito a condiciones de estrés ambiental.

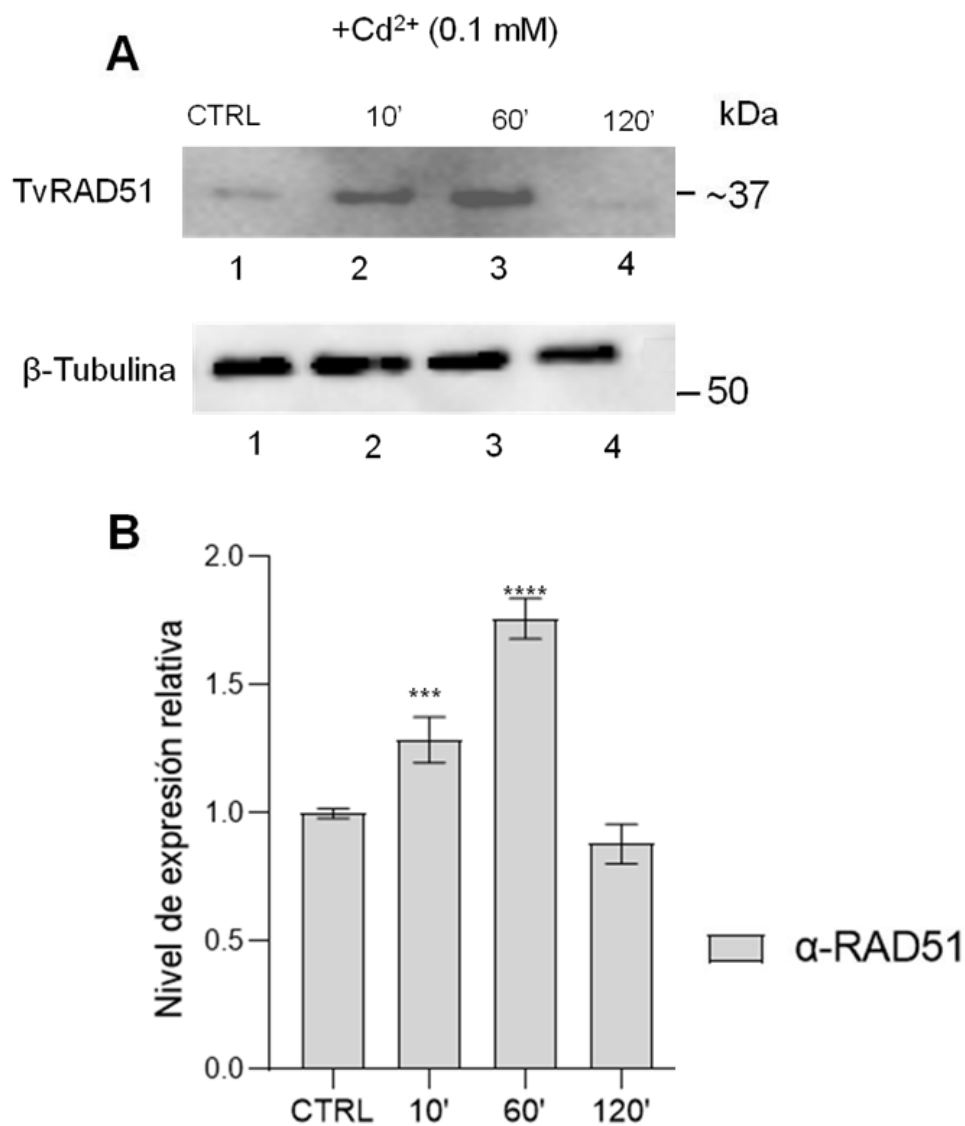


Figura 16. Abundancia de la proteína TvRAD51 en *T. vaginalis* con tratamientos de Cd²⁺

A) Banda de 37 kDa inmunoreconocida por los anticuerpos anti- hRAD51. Control de carga anti h β -tubulina. En condiciones de Zn²⁺ concentración de 1.6 mM. Carril 1. Control. Carril 2. 10 minutos. Carril 3. 60 minutos. Carril 4. Tiempo de 120 minutos. Carril 5 24 horas. B) Análisis densitométrico de intensidad de píxeles de la expresión de TvRAD51. El experimento se realizó por triplicado y se determinó la significancia estadística por prueba de ANOVA y post hoc (tukey) comparando las desviaciones estándar de cada condición. p<0.001 se consideró estadísticamente significativo (***).

8.6 Localización de la proteína TvRAD51 de *T. vaginalis* en presencia de Zn²⁺

Para determinar la localización de TvRAD51 y la abundancia de esta proteína dentro de *T. vaginalis* a los 10 minutos, 60 minutos y 120 minutos de tratamiento con Zn²⁺ (1.6 mM), se realizó una inmunofluorescencia indirecta en una laminilla con los parásitos fijados y permeabilizados, los cuales se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-hRAD51 en una dilución 1:50 y con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) AffiniPure™ en una dilución 1:50.

Por microscopia confocal se observó que la proteína se encuentra localizada principalmente en núcleo del parásito en la condición control.

Los resultados nos indican un incremento en la intensidad de la fluorescencia de la proteína en los parásitos tratados con Zn²⁺. La proteína RAD51 se ve incrementada en los tiempos de 10 minutos y 60 minutos y una disminución a los 120 minutos. Este resultado sugiere que la proteína participa activamente en los mecanismos de reparación del ADN del parásito, especialmente en respuesta a los tratamientos temporales aplicados. Además, indica la capacidad del parásito para activar mecanismos de adaptación frente a condiciones de estrés ambiental, lo que podría facilitar su supervivencia en entornos hostiles. (Fig.17).

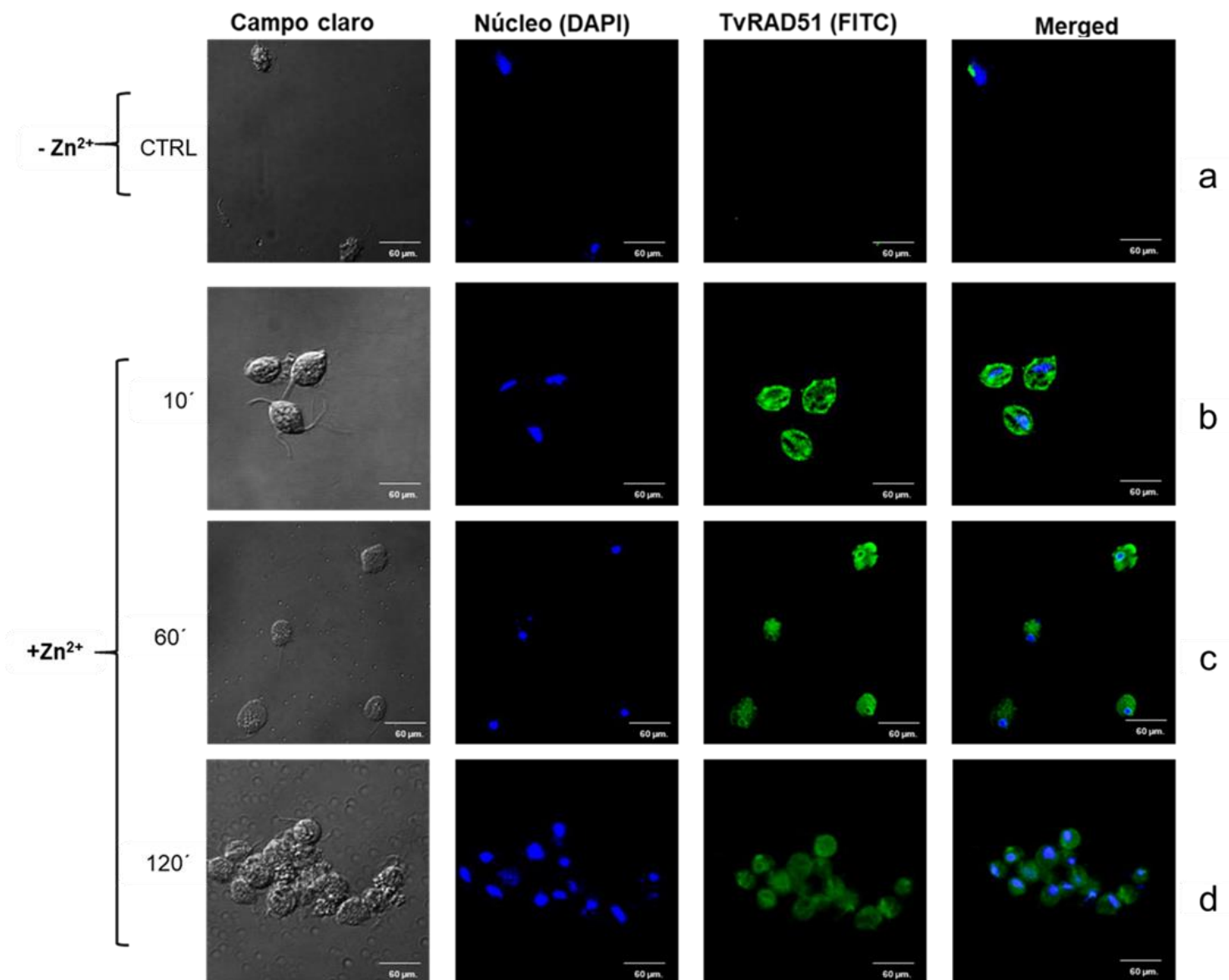


Figura 17: Localización de la proteína TvRAD51. Tratamiento de Zn²⁺.

Ensayo de inmunofluorescencia de *T. vaginalis* (1-4). Con tratamientos de Zn²⁺ a una concentración de 1.6 mM, incubados con el anticuerpo anti-RAD51 seguido del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con un anticuerpo de fluoresceína (FITC) y montado en Vecta shield-DAPI. Fotografía tomada con microscopía confocal. CTRL) Control. 10') Tratamiento de 10 minutos. 60') Tratamiento de 60 minutos. 120') Tratamiento de 120 minutos. A) Barra de escala 60 µm, B) Barra de escala 10 µm

8.7 Localización de la proteína TvRAD51 en *T. vaginalis* en presencia de Cd²⁺

Para determinar la localización de TvRAD51 y la abundancia dentro del parásito *T. vaginalis* con el tratamiento de Cd²⁺ (0.1 mM) y bajo los tiempos de 10 minutos, 60 minutos y 120 minutos, se realizó una inmunofluorescencia indirecta en una laminilla con los parásitos fijados y permeabilizados, los cuales se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-hRAD51 en una dilución 1:50 y con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) AffiniPure™ en una dilución 1:50.

Por microscopia confocal se observó que la proteína se encuentra localizada principalmente en núcleo del parásito en la condición control (CTRL).

Los resultados nos indican solo el incremento de la intensidad de la fluorescencia de la proteína en los parásitos tratados con Cd²⁺ bajo el tratamiento de 60 minutos, mientras que en los tiempos de 10 y 120 minutos se encuentra disminuida intensidad. La proteína RAD51 se observa principalmente en los 60 minutos lo que nos indica que el parásito se adapta a los niveles de Cd²⁺ a diferencia de la presencia de Zn²⁺.

No puede tener una adaptación para Cd²⁺ que posiblemente no pertenece al tracto urogenital. Este resultado no indica que posiblemente el parásito puede tener los mecanismos de reparación del ADN y la adaptación a condiciones de estrés como Cd²⁺ (Fig18).

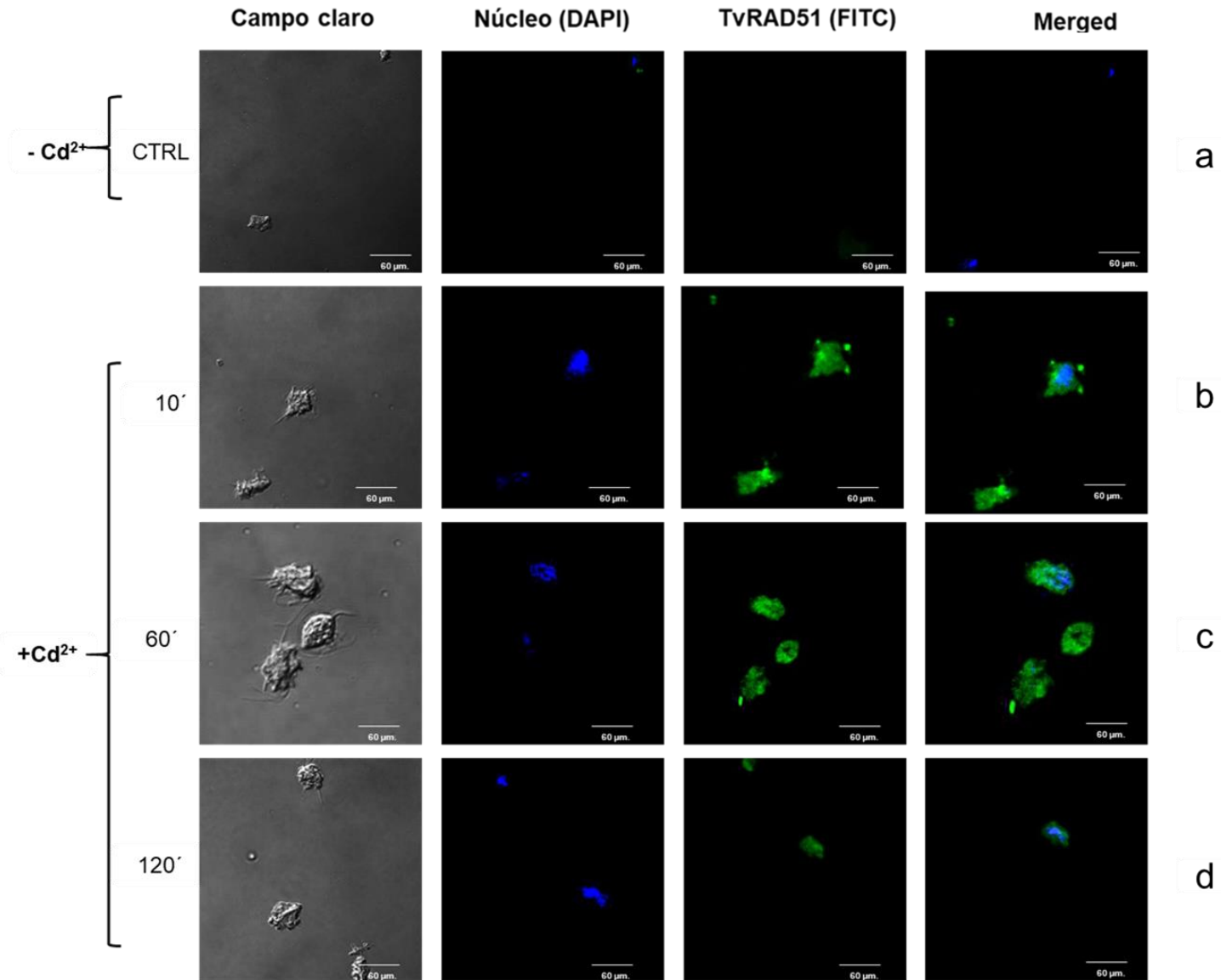


Figura 18: Localización de la proteína TvRAD51. Tratamiento de Cd²⁺

Ensayo de inmunofluorescencia de *T. vaginalis* (1-4). Tratamientos de Cd²⁺ 0.1 mM, incubados con el anticuerpo anti-RAD51 seguido del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con de fluoresceína (FITC) y montado en Vectashield-DAPI. Fotografía tomada con microscopía confocal. CTRL) Control. 10') Tratamiento de 10 minutos. 60') Tratamiento de 60 minutos. 120') Tratamiento de 120 minutos. A) Barra de escala 60 μm, B) Barra de escala 10 μm.

9. Discusión

La patogénesis de *T. vaginalis* es un proceso complejo que involucra varios cationes esenciales para la infección. Entre estos, el Zn^{2+} es particularmente relevante debido a su papel en la citotoxicidad, un mecanismo ampliamente caracterizado que facilita la invasión del parásito en los tejidos del hospedero en concentraciones fisiológicas no ocurre eso, ojo con eso (Puente-Rivera *et.al.*, 2017; Quintas-Granados, Figueroa-Angulo *et.al.*, 2012). Este catión actúa no solo como un cofactor enzimático, sino también como un modulador positivo de la respuesta inmune del hospedero, lo que puede favorecer la supervivencia de *T. vaginalis* en el entorno hostil del tracto urogenital. Por otro lado, el Cd^{2+} , aunque es un catión relativamente menos estudiado, ha sido implicado en la actividad de ciertas metaloproteinasas del parásito. Estas metaloproteinasas pueden jugar un rol en la degradación de la matriz extracelular del hospedero, facilitando la invasión y colonización por parte del parásito (Netzahualcoyotzi *et.al.*, 2019).

El Zn^{2+} no solo es fundamental en procesos biológicos normales, sino que también podría actuar como un agente selectivo en la presión evolutiva, favoreciendo que aislados de *T. vaginalis* desarrollen mecanismos para adaptarse a concentraciones elevadas de este catión (Villalpando *et.al.*, 2017). El Cd^{2+} , en contraste, es un metal pesado que generalmente no se encuentra de forma natural en el cuerpo humano, pero puede estar presente debido a factores ambientales como la contaminación y el tabaquismo (Netzahualcoyotzi *et.al.*, 2019). El Cd^{2+} es conocido por su capacidad para inducir estrés oxidativo, un factor que puede dañar tanto al parásito como a las células del hospedero lo que podría agravar la infección y a su vez complicar el tratamiento (Puente-Rivera *et.al.*, 2017).

Se ha demostrado que un incremento en la concentración de Zn^{2+} y/o Cd^{2+} podrían causar un daño al parásito (Moreno Reyes, PCG, 2016) y tal vez daño al material genético, generando rupturas en la doble cadena de ADN lo que involucraría la maquinaria de reparación de ADN (Chiba y Yasui, 2020), la recombinación homóloga es uno de los encargados de la reparación de la hebras dañadas por medio de un conjunto de proteínas como la recombinasa RecA/RAD51 y proteínas homologas presente en procariontes, bacterias y algunas arqueas (Kowalczykowski, 2015).

La recombinación homóloga (RH) ha sido ampliamente documentada en eucariotas, incluidos los protozoarios parásitos como *T. brucei*, *P. falciparum* (Wassing y Esashi, 2021). Estos parásitos, que también enfrentan condiciones de estrés genotóxico, dependen de la recombinación homóloga para sobrevivir en ambientes hostiles. De manera similar, se han identificado homólogos de la familia RAD51 en otros parásitos como *E. histolytica* (López-Casamichana *et.al.*, 2008) y *L. infantum* (Genois *et.al.*, 2015), lo que sugiere que este mecanismo de reparación es esencial para la supervivencia de un amplio rango de parásitos. En *T. vaginalis* estudios *in silico* han confirmado la presencia del gen *tvrad51*, con dominios funcionales como RecA, que han sido mapeados en el parásito, identificándose los dominios RecA1 (89-260 pb) y RecA2 (267-329 pb).

Los niveles de expresión de la proteína RAD51 en *T. vaginalis* están influenciados por la presencia de Zn^{2+} y Cd^{2+} . El Zn^{2+} , al ser un catión naturalmente presente en el tracto urogenital, parece inducir una mayor expresión de RAD51 en comparación con el Cd^{2+} , que, aunque tóxico, no es endógeno (Rahman *et.al.*, 2019).

Un daño endógeno como la acumulación de ERO o exógenos como radiaciones o concentraciones no naturales de metales pesados pueden producir un daño al material genético de las eucariotas y los protozoarios parásitos. *T. vaginalis* puede tener varios factores que le inducen daño genético, como genotóxicos, radiaciones UV o estrés oxidativo. La reparación de este material dañado es arreglado por RAD51 en focos nucleares, donde se lleva a cabo la reparación de las lesiones del ADN (Filippo *et.al.*, 2008; Chuang *et.al.*, 2008).

En ensayos con concentraciones de Zn^{2+} (1.6 mM), se observó un aumento de la proteína RAD51 en el núcleo a los 10 y 60 minutos de tratamiento, sugiriendo una rápida respuesta del parásito al daño que puede generar este catión. Este comportamiento no solo se observó en Zn^{2+} sino que también con el metal Cd^{2+} (0.1 mM), donde solo a los 10 y 60 minutos se notó un incremento en la localización nuclear de RAD51, lo que sugiere que RAD51 se encuentra activa reparando el material genético dañado cuando el tiempo de exposición de concentraciones de metales se encuentra presente.

Como ya mencionamos, la recombinación homóloga y la reparación del ADN son procesos funcionales llevados a cabo principalmente por un grupo de proteínas especializadas en estos mecanismos. Las proteínas recombinasas principales son DMC1, que juega un papel crucial durante la meiosis, y RAD51, que es fundamental en la mitosis y en la fase G2/S del ciclo celular en eucariotas. Estas proteínas facilitan el emparejamiento y la reparación de hebras de ADN dañadas mediante un proceso que asegura la fidelidad en la transmisión del material genético (Jingfei Xu *et al.*, 2021). Mediante inmunofluorescencia se observó que la localización de RAD51 en el núcleo está relacionada a la respuesta a estos cationes y que la proteína no está activa de manera continua en *T. vaginalis*, sino que su expresión y localización dependen del tipo y la gravedad del daño genético sufrido por el parásito (Krejci *et al.*, 2012). Esto subraya la importancia de RAD51 en la capacidad de *T. vaginalis* para adaptarse y sobrevivir en condiciones hostiles, como para actuar ante el daño al ADN y sugiere que la manipulación de estos cationes podría ser una estrategia efectiva para controlar la colonización y procesos de la infección.

10. Conclusiones

- La presencia de iones metálicos en cultivos de *T. vaginalis* induce una expresión de *tvrad51* a nivel de transcrito y a nivel de proteína.
- La presencia de iones metálicos en cultivos de *T. vaginalis* generan un aumento de la proteína RAD51 en el núcleo del parásito.
- Existe mayor abundancia de la proteína RAD51 en presencia de iones metálicos en los tiempos de 10 y 60 minutos.

Perspectivas

- Estudio de formación de filamento durante la recombinación homóloga en el parásito *Trichomonas vaginalis* tratadas con Zn^{2+} y Cd^{2+} .
- Determinar interacción de TvRAD51 con otras proteínas de la maquinaria de recombinación homóloga.

Referencias

1. Alderete, J.F., Millsap, K.W., Lehker, M.W., Benchimol, M. (2001). Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry y functional diversity. *Cellular Microbiology*, 3(6), pp.359–370. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00126.x>.
2. Ames, B.N. (1999). Micronutrient Deficiencies: A Major Cause of AND Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, [online] 889(1), pp.87–106. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08727.x>.
3. Apt Baruch Werner Louis. *Parasitología humana*. 1º Ed. España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L; 2013.
4. Arreola, R., José Luis Villalpando, Puente-Rivera, J., Morales-Montor, J., Rudiño-Piñera, E. y María Elizabeth Alvarez-Sánchez (2018). *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase TvMP50 is a monomeric Aminopeptidase P-like enzyme. *Molecular biotechnology*, [online] 60(8), pp.563–575. doi: <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0097-0>.
5. Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. y Alderete, J.F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation yadhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, [online] 7(2), pp.299–309. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01121.x>.
6. Aten, J.A., Stap, J., Krawczyk, P.M., Oven, van, Hoebe, R.A., Jeroen Essers y Kanaar, R. (2004). Dynamics ofADNDouble-Strand Breaks Revealed by Clustering of Damaged Chromosome Domains. *Science*, [online] 303(5654), pp.92–95. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1088845>.
7. Augustyniak, M., Agnieszka Babczyńska, Michal Kozłowski, Sawczyn, T. y Augustyniak, M. (2008). Effects of zincyfemale aging on nymphal life history in a grasshopper from polluted sites. *Journal of Insect Physiology*, [online] 54(1), pp.41–50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.08.002>.
8. Bishop, D.K., Park, D., Xu, L. y Kleckner, N. (1992). DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation,y cell cycle progression. *Cell*, [online] 69(3), pp.439–456. doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90446-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90446-j).
9. Bonilla, B., Hengel, S.R., Grundy, M.K. y Bernstein, K.A. (2020). *RAD51* Gene Family Structure and Function. *Annual Review of Genetics*, [online] 54(1), pp.25–46. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021920-092410>.
10. Cao, X., Fu, M., Bi, R., Zheng, X., Fu, B., Tian, S., Liu, C., Li, Q. y Liu, J. (2021). Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway. *Chemosphere*, [online] 263,

pp.128346–128346.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128346>.

11. Carlton, J.M., Hirt, R., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, C.M., Sebastien Besteiro, Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van, Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D.yMuller, S. (2007). Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, [online] 315(5809), pp.207–212. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1132894>.
12. Cheon, S.-H., Seung Ryong Kim, Song, H.-O., Ahn, M.-H.yRyu, J.-S. (2013). The Dimension of *Trichomonas vaginalis* as Measured by Scanning Electron Microscopy. *Korean Journal of Parasitology*, [online] 51(2), pp.243–246. doi: <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.2.243>.
13. Conexión Cinvestav (2019). Diseñan kit de diagnóstico contra la tricomoniasis. [Online] Conexión. Available at: [https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/dise241an-kit-de-diagn243stico-contra-la-tricomoniasis#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20se%20reportan%20cerca,entre%20la%20poblaci%C3%B3n%20sexualmente%20activa](https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/dise241an-kit-de-diagn243stico-contra-la-tricomoniasis#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20se%20reportan%20cerca,entre%20la%20poblaci%C3%B3n%20sexualmente%20activa.). [Accessed 22 Feb. 2024].
14. Crickard, J.Brooks.yGreene, E.C. (2018). Biochemical attributes of mitotic and meiotic presynaptic complexes.ADNRepair, [online] 71, pp.148–157. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.018>.
15. Critical Reviews in Toxicology. (2022). Cadmium exposure andADNdamage (genotoxicity): a systematic review and meta-analysis. [online] Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408444.2023.2173557> [Accessed 13 Mar. 2024].
16. Diéguez, S. (2014). Tricomoniasis: una visión amplia. *Iatreia*, [online] 27(2), pp.198–205. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-07932014000200007&script=sci_abstract&tlng=es [Accessed 12 Mar. 2024].
17. Drinkwater, P. (1987). Metronidazole. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, [online] 27(3), pp.228–230. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1479-828x.1987.tb00994.x>.
18. Field, N., Clifton, S., Alexander, S., Ison, C.A., Khanom, R., Saunders, P., Hughes, G., Heath, L., Beddows, S., Mercer, C.H., Tanton, C., Johnson, A.M.ySonnenberg, P. (2016). *Trichomonas vaginalis* infection is uncommon in the British general population: implications for clinical testing and public health screening. *Sexually Transmitted Infections*, [online] 94(3), pp.226–229. doi: <https://doi.org/10.1136/sextrans-2016-052660>.

19. Gómez-Conde, E., Mena-Lopez, R., Hernandez-Jauregui, P., Gonzalez-Camacho, M. y Arroyo, R. (2000). Trichomonas vaginalis: Chromatin Mitotic Spindle during Mitosis. *Experimental Parasitology*, [online] 96(3), pp.130–138. doi: <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4551>.
20. Gould Sb, Garg Sg, Handrich M, Nelson-Sathi S, Gruenheit N, Tielens Agm y Wf, M. (2019). Adaptation to life on land at high O₂ via transition from ferredoxin-to NADH-dependent redox balance. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, [online] 286(1909), pp.20191491–20191491. doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1491>.
21. Granéli, A., Yeykal, C.C., Robertson, R.B. y Greene, E.C. (2006). Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 103(5), pp.1221–1226. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0508366103>.
22. H. Hernández, Sariego, I., Garber, G., Delgado, R., O. López y J. Sarracent (2004). Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite immunology*, [online] 26(3), pp.119–125. doi: <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00690.x>.
23. Haber, J.E. (1999) ADNrecombination: the replication connection. *Trends in Biochemical Sciences*, [online] 24(7), pp.271–275. doi: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01413-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01413-9).
24. Han, Z., Yan, Q., Ge, W., Liu, Z.-G., Sangiliyandi Gurunathan, Massimo De Felici, Shen, W. y Zhang, X.-F. (2016). Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. *International Journal of Nanomedicine*, [online] Volume 11, pp.5187–5203. doi: <https://doi.org/10.2147/ijn.s111447>.
25. Harp, D.F. y Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, [online] 157(1), pp.3–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.02.024>.
26. Her, J. y Bunting, S.F. (2018). How cells ensure correct repair ofADNdouble-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, [online] 293(27), pp.10502–10511. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.tm118.000371>.
27. Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G. y Arroyo, R. (2004). Trichomonas vaginalis: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*, [online] 107(3-4), pp.125–135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.05.004>.
28. Ho, E., Wong, C.P. y King, J.C. (2022). Impact of zinc onADNintegrity and age-related inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, [online] 178, pp.391–397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.256>.

29. Ho, E., Wong, C.P. y King, J.C. (2022). Impact of zinc on ADN integrity and age-related inflammation. *Free radical biology & medicine*, [online] 178, pp.391–397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.256>.
30. Hung, H.-H., Huang, W.-P. y Pan, C.-Y. (2013). Dopamine- and zinc-induced autophagosome formation facilitates PC12 cell survival. *Cell Biology and Toxicology*, [online] 29(6), pp.415–429. doi: <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9261-2>.
31. Itzel, S. (2021). Identificación de RAD51 en trichomonas vaginalis en presencia de Zn²⁺ y Cd²⁺. Repositorio institucional uacm.mx. [online] doi: <http://repositorioinstitucionaluacm.mx/jspui/handle/123456789/2201>.
32. Kawthar Bouchemal, Bories, C. y Loiseau, P.M. (2017). Strategies for Prevention and Treatment of Trichomonas vaginalis Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] 30(3), pp.811–825. doi: <https://doi.org/10.1128/cmr.00109-16>.
33. Keeney, S., Giroux, C.N. y Kleckner, N. (1997). Meiosis-Specific ADN Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. *Cell*, [online] 88(3), pp.375–384. doi: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81876-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81876-0).
34. Kent, H.L. (1991). Epidemiology of vaginitis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, [online] 165(4), pp.1168–1176. doi: [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(12\)90722-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(12)90722-x).
35. Kissinger, P., Amedee, A., Clark, R.A., Dumestre, J., Theall, K.P., Myers, L., Hagensee, M.E., Farley, T.A. y Martin, D.H. (2009). Trichomonas vaginalis Treatment Reduces Vaginal HIV-1 Shedding. *Sexually Transmitted Diseases*, [online] 36(1), pp.11–16. doi: <https://doi.org/10.1097/olq.0b013e318186decf>.
36. Kummer, S., Hayes, G.R., Gilbert, R.O., Beach, D.H., Lucas, J.J. y Singh, B.N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by Trichomonas vaginalis cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis*, [online] 44(3), pp.197–203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.09.004>.
37. Lau, A.H., Lam, N.P., Piscitelli, S.C., Wilkes, L. y Danziger, L.H. (1992). Clinical Pharmacokinetics of Metronidazole and Other Nitroimidazole Anti-Infectives. *Clinical Pharmacokinetics*, [online] 23(5), pp.328–364. doi: <https://doi.org/10.2165/00003088-199223050-00002>.
38. Laura Itzel Quintas-Granados, José Luis Villalpando, Laura Isabel Vázquez-Carrillo, Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G. y María Elizabeth Álvarez-Sánchez (2013). TvMP50 is an Immunogenic Metalloproteinase during Male Trichomoniasis. *Molecular & cellular proteomics*, [online] 12(7), pp.1953–1964. doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.m112.022012>.

39. Leherker, M.W., Chang, T.H., Dailey, D.C. y Alderete, J.F. (1990). Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Experimental Medicine*, [online] 171(6), pp.2165–2170. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.171.6.2165>.
40. Lindahl, T. y Barnes, D.E. (2000). Repair of Endogenous ADN Damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology/Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, [online] 65(0), pp.127–134. doi: <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>.
41. Luisa, A., De La Garza, B., Haydée González De La, C., Le, R. y Le Gall, B. (2012). MATERIAL DIDÁCTICO MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR AUTORAS. [online] Available at: https://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual_de_Prcticas_de_BM.pdf.
42. M. Scott Brown y Bishop, D.K. (2014) ADN Strand Exchange and RecA Homologs in Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [online] 7(1), pp. a016659–a016659. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016659>.
43. Ma, Y., Ulrich Pannicke, Schwarz, K. y Lieber, M.R. (2002). Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell*, [online] 108(6), pp.781–794. doi: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00671-2).
44. Malik, S.-B., Pightling, A.W., Stefaniak, L.M., Schurko, A.M. y Logsdon, J.M. (2008). An Expanded Inventory of Conserved Meiotic Genes Provides Evidence for Sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLOS ONE*, [online] 3(8), pp.e2879–e2879. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002879>.
45. María Elizabeth Alvarez-Sánchez, Avila-González, L., Becerril-García C., Loriz Viridiana Fattel-Facenda, Ortega-López, J. y Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, [online] 28(4), pp.193–202. doi: <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0336>.
46. Martínez Pérez, M., Manuel, J. y Ontiveros, Ú. (n.d.). GRADO EN FARMACIA TRICHOMONAS VAGINALIS Y TRICOMONIASIS. [Online] Available at: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103257/MARTINEZ%20PEREZ%20MARIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
47. Martínez-Espinosa, R., Raúl Argüello-García, Saavedra, E. and Ortega-Pierres, G. (2015). Albendazole induces oxidative stress and ADN damage

in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Frontiers in microbiology*, [online] 6. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00800>.

48. Masson, J.-Y. y West, S.C. (2001). The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends in Biochemical Sciences*, [online] 26(2), pp.131–136. doi: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01742-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01742-4).
49. Mendiola, J., Moreno, J.M., Roca, M., Nuria Vergara-Juárez, Martínez-García, M.J., García-Sánchez, A., Belén Elvira-Rendueles, López-Espín, J.J., Ten, J., Bernabeu, R. y Torres-Cantero, A.M. (2011). Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environmental health*, [online] 10(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1476-069x-10-6>.
50. Miklós Müller, Mentel, M., Hellemond, van, Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.-Y., Mark, Tielens, M. y Martin, W.F. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, [online] 76(2), pp.444–495. doi: <https://doi.org/10.1128/mnbr.05024-11>.
51. Moore, J.K. y Haber, J.E. (1996). Cell Cycle and Genetic Requirements of Two Pathways of Nonhomologous End-Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, [online] 16(5), pp.2164–2173. doi: <https://doi.org/10.1128/mcb.16.5.2164>.
52. Olmos, A. (n.d.). FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO TÍTULO: ENDOSIMBIOSIS VIRUS Y PARÁSITOS. [online] Available at: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANA%20LIRA%20OLMOS.pdf>.
53. OSATO (2019). Production of tertiomycin (a new antibiotic substance), azomycin and eurocidin by *S. eurocidicus*. *The Journal of antibiotics*, [online] 8(4). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13286189/> [Accessed 28 Feb. 2024].
54. Pannunzio, N.R., Watanabe, G. y Lieber, M.R. (2018). NonhomologousADNend-joining for repair ofADNdouble-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, [online] 293(27), pp.10512–10523. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.tm117.000374>.
55. Patel, E.U., Gaydos, C.A., Packman, Z.R., Quinn, T.C. y Tobian, A.A.R. (2018). Prevalence and Correlates of *Trichomonas vaginalis* Infection Among Men and Women in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, [online] 67(2), pp.211–217. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy079>.
56. Pereira-Neves, A., Karla Consort Ribeiro y Benchimol, M. (2003). Pseudocysts in *Trichomonads* – New Insights. *Protist*, [online] 154(3-4), pp.313–329. doi: <https://doi.org/10.1078/143446103322454095>.

57. Pier Luigi Fiori, Rappelli, P. y Maria Filippa Addis (1999). The flagellated parasite: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes and Infection*, [online] 1(2), pp.149–156. doi: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80006-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80006-9).
58. Puente-Rivera, J., José Luis Villalpando, Villalobos-Osnaya, A., Laura Isabel Vázquez-Carrillo, León-Ávila, G., María Dolores Ponce-Regalado, César López-Camarillo, Jose Miguel Elizalde-Contreras, Eliel Ruiz-May, Arroyo, R. y María Elizabeth Alvarez-Sánchez (2017). The 50 kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, [online] 217, pp.32–41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.09.001>.
59. Ramesh, M.A., Malik, S.-B. y Logsdon, J.M. (2005). A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes. *Current Biology*, [online] 15(2), pp.185–191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.003>.
60. Rao, P., Qiao, H., Bhatt, S.K., Logan, Tran, H.D., Bourne, S.L., Qiu, W., Deshpande, A., Sharma, A.N., Beebout, C.J., Pezza, R.J. y Hunter, N. (2017). A SUMO-ubiquitin relay recruits proteasomes to chromosome axes to regulate meiotic recombination. *Science*, [online] 355(6323), pp.403–407. doi:<https://doi.org/10.1126/science.aaf6407>.
61. Rashid, S., Arshad, M., Siddiqa, M. y Ahmad, R. (2018). Evaluation ofADNdamage in traffic police wardens of Pakistan due to cadmium and zinc. *Science of The Total Environment*, [online] 630, pp.1360–1364. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.254>.
62. Rowley, J., Stephen Vander Hoorn, Eline Korenromp, Low, N., Magnus Unemo, Abu-Raddad, L.J., R Matthew Chico, Smolak, A., Newman, L., Gottlieb, S., Soe Soe Thwin, Broutet, N. y Taylor, M.M. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of The World Health Organization*, [online] 97(8), pp.548–562P. doi: <https://doi.org/10.2471/blt.18.228486>.
63. Ryu, J.-S. y Min, D.-Y. (2006). *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, [online] 44(2), pp.101–101. doi: <https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.2.101>.
64. Schumacher, M.A., Audrey O.T. Lau y Johnson, P.J. (2003). Structural Basis of Core Promoter Recognition in a Primitive Eukaryote. *Cell*, [online] 115(4), pp.413–424. doi:[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00887-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00887-0).
65. Science. (2021). Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. [online] Available at: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1132894> [Accessed 12 Mar. 2024].
66. Secretaría de Salud (2024). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [online] gob.mx. Available at:

<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica> [Accessed 28 Feb. 2024].

67. Short, J.M., Liu, Y., Chen, S., Soni, N., Madhusudhan, M.S., Mahmud Kk Shivji y Ashok Ramakrishnan Venkitaraman (2016). High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-strandedADNby electron cryo-microscopy. *Nucleic Acids Research*, [online] pp. gkw783–gkw783. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw783>.
68. Stephen Kenneth Godin, Meghan Rose Sullivan y Kara Anne Bernstein (2016). Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination andADNreplication. *Biochemistry and Cell Biology*, [online] 94(5), pp.407–418. doi: <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0012>.
69. World (2023). Trichomoniasis. [Online] Who.int. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trichomoniasis> [Accessed 22 Feb. 2024].

12. Anexos

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
NADA HUMANO ME ES AJENO

La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
y el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE

otorgan la presente

CONSTANCIA

a: FLORES VEGA JOSÉ JESÚS

Por su participación en el Simposio Internacional
Genómica: de lo molecular a lo traslacional.

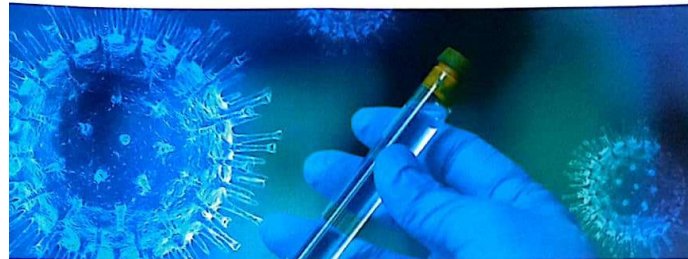
24 y 25 de Septiembre del 2024


Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez
Coordinadora del Simposio UACM


Mtro. César Enrique Plascencia Hernández
Coordinador Académico UACM


Dr. Ricardo Raúl Esparza Ávila
Subdirector de Enseñanza e Investigación


Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada
Jefa de División de Medicina Genómica



UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
NADA HUMANO ME ES AJENO



La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
y la Sociedad Mexicana de Virología
otorgan la presente

Constancia a

José Jesús Flores Vega

por su asistencia a la
Jornada Académica

**Virus, Antivirales y Vacunas de
Importancia para la Salud Pública**

realizada en el plantel Del Valle
el 9 de noviembre de 2024.

Nada humano me es ajeno


Dra. María Elizabeth
Álvarez Sánchez
Coordinadora
Académica-UACM


Mtra. Erlinda Lorena
Álvarez Ramírez
Coordinadora del Colegio
de Ciencia y Tecnología-UACM


Dra. María
Yocupido Monroy
Coordinadora de la
Jornada Académica


Dra. Sofía Lizeth
Alcaraz Estrada
Sociedad Mexicana
de Virología



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage:



RAD51 recombinase and its paralogs: Orchestrating homologous recombination and unforeseen functions in protozoan parasites

Jose Jesús Flores-Vega^a, Jonathan Puente-Rivera^{a,b,**}, Sharon Itzel Sosa-Mondragón^a,
Minerva Camacho-Nuez^a, María Elizabeth Alvarez-Sánchez^{a,*}

^a Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo #290, Col. Del Valle, CP 03100, Mexico City, Mexico

^b División de Investigación. Hospital Juárez de México, Ciudad de México, 07760, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Homologous recombination (HR)
Double-stranded breaks (DSB)
RAD51 recombinase
Parasites
DNA damage response (DDR)

ABSTRACT

The DNA of protozoan parasites is highly susceptible to damage, either induced by environmental agents or spontaneously generated during cellular metabolism through reactive oxygen species (ROS). Certain phases of the cell cycle, such as meiotic recombination, and external factors like ionizing radiation (IR), ultraviolet light (UV), or chemical genotoxic agents further increase this susceptibility. Among the various types of DNA damage, double-stranded breaks (DSBs) are the most critical, as they are challenging to repair and can result in genetic instability or cell death. DSBs caused by environmental stressors are primarily repaired via one of two major pathways: non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination (HR). In multicellular eukaryotes, NHEJ predominates, but in unicellular eukaryotes such as protozoan parasites, HR seems to be the principal mechanism for DSB repair. The HR pathway is orchestrated by proteins from the RAD52 epistasis group, including RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, and the MRN complex. This review focuses on elucidating the diverse roles and significance of RAD51 recombinase and its paralogs in protozoan parasites, such as *Acanthamoeba castellanii*, *Entamoeba histolytica* (Amoebozoa), apicomplexan parasites (Chromalveolata), *Naegleria fowleri*, *Giardia* spp., *Trichomonas vaginalis*, and trypanosomatids (Excavata), where they primarily function in HR. Additionally, we analyze the diversity of proteins involved in HR, both upstream and downstream of RAD51, and discuss the implications of these processes in parasitic protozoa.

1. Introduction

Protozoan parasitic diseases represent a significant global public health challenge, with substantial economic impacts on infectious disease prevalence worldwide. Severe illnesses, such as malaria (*Plasmodium* spp.), cutaneous and visceral leishmaniasis (*Leishmania* spp.), African sleeping sickness (*Trypanosoma brucei*), and amoebic dysentery (*Entamoeba histolytica*), threaten the lives of nearly one-sixth of the global population (Fletcher et al., 2012). The World Health Organization (WHO) has identified diarrhea caused by intestinal protozoa, such as *E. histolytica* and *Giardia intestinalis*, as the second leading cause of morbidity and mortality in children under five years old (World Health Organization, 2024). The prevalence of protozoan parasitic diseases has increased in recent years, due to the lack of effective vaccines and growing resistance to antiparasitic drugs (Capela et al., 2019). Parasites

develop complex mechanisms for drug resistance, while cells possess intricate systems to maintain DNA integrity by activating repair pathways when genetic alterations occur, potentially leading to mutations or cell death and collectively, these processes constitute the DNA damage response (DDR) (Huang and Zhou, 2020). DNA damage can arise from endogenous sources, such as reactive oxygen species (ROS) or free radicals produced during respiration and metabolism, as well as from replication errors. Exogenous factors, such as ultraviolet (UV) light—causing pyrimidine dimers—and ionizing radiation—inducing various types of base damage, including indirect DNA damage—can also harm DNA (Rodgers and McVey, 2016). Homologous recombination (HR) is a critical pathway for maintaining genomic integrity. It plays essential roles in meiosis, chromosome segregation, DNA repair, and tolerance to DNA damage, as well as in recovering stalled replication forks (Chakraborty et al., 2023), including the repair of DNA DSBs

* Corresponding author.

** Corresponding author. Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo #290, Col. Del Valle, CP 03100,

(Cannan and Pederson, 2016). In eukaryotes, HR is mediated by genes in the Rad52 epistasis group, including Rad51, Rad54, and BLM proteins, which function at various stages of the HR process. RAD51, a key recombinase, facilitates the transfer of damaged DNA strands to their undamaged homologous counterparts for repair by forming a stable nucleoprotein filament (Rad51-ssDNA) (Mazin Alexander et al., 2000; Sung et al., 2003; K Balakrishnan et al., 2009). HR is a conserved mechanism identified in non-model unicellular eukaryotes, such as *T. brucei* (Kelso et al., 2017) and *Plasmodium falciparum* (Kirkman et al., 2014), with RAD51 homologs described in *E. histolytica* (López-Casamichana et al., 2008) and *Leishmania infantum* (Genois et al., 2015). Protozoan parasites face threats to their DNA integrity from both environmental factors and endogenous cellular processes. This review examines the role of RAD51 and its paralogs in maintaining genome stability and highlights their additional, unexpected functions in these organisms.

2. DNA damage and repair mechanisms: general overview

Environmental DNA damage can result from various sources, including physical genotoxic agents such as ionizing radiation (IR) and ultraviolet (UV) light. IR oxidizes DNA bases and can cause both single- and double-stranded DNA breaks, while UV light induces the formation of pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts, potentially leading to DSBs. Among the types of DNA lesions caused by IR, DSBs are particularly critical, as they are the primary culprits behind cell death. If left unrepaired or improperly repaired, DSBs in multicellular organisms can result in chromosomal aberrations, contributing to human disorders such as cancer (Vignard et al., 2013). Additionally, alkylating agents, cross-linking agents, and topoisomerase inhibitors can compromise DNA integrity through mechanisms like the formation of N- and O-methyl DNA adducts, including N7-methylguanine (7meG), N3-methyladenine (3meA), and O6-methylguanine (O6meG). Methylated DNA adducts (MDAs) have cytotoxic and mutagenic properties because they block gene transcription and disrupt the fidelity of DNA replication (Li et al., 2021a; Xu and Her, 2015). Spontaneous DNA damage can also occur during replication due to the incorrect incorporation of dNTPs, base interconversion, depurination, and alkylation of DNA bases. Reactive oxygen species (ROS), generated during normal cellular metabolism, can further oxidize DNA bases and induce DSBs (Lindahl and Barnes, 2000). DSBs are particularly harmful, as even a single unrepaired DSB can lead to cell death, while improper repair can cause genomic instability (Ciccia and Elledge, 2010; Shibata and Jeggo, 2014). Effective DNA repair is essential for cell survival and involves complex signaling cascades comprising sensors, transducers, and effector proteins, along with regulatory pathways primarily involved in cell cycle regulation (Harper and Elledge, 2007; Zhou and Elledge, 2000; Molinaro et al., 2021). HR is a highly conserved and accurate repair mechanism. In yeast, HR is preferentially utilized over other repair pathways, in contrast to mammals (Her and Bunting, 2018). HR involves homology search, strand pairing, exchange, and regeneration between homologous DNA strands, promoting genetic variability and contributing to evolution through the exchange of genetic information (Cromie et al., 2001). Protozoan parasites like *Giardia intestinalis* also experience DNA damage from intracellular ROS production, which leads to oxidative stress, particularly following treatments like albendazole (Martínez-Espinosa et al., 2015).

3. Specialized proteins and mechanism of homologous recombination (HR)

The primary molecular machinery responsible for HR and DNA repair induced by ionizing radiation in unicellular eukaryotes, such as *Saccharomyces cerevisiae*, includes the highly conserved genes of the RAD52 epistasis group (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54/TID1*, *MRE11/RAD58*, and *XRS2*) (Barnes and

McCulloch, 2007). HR is a high-fidelity DNA repair pathway that utilizes a homologous template for the accurate repair of DNA damage. Beyond its role in DNA lesion repair, HR is also essential for organismal growth, development, and adaptation by promoting genetic diversity and ensuring proper chromosomal segregation during meiosis (Saito and Colaiácovo, 2017). The HR mechanism predominates during the S and G2 phases of the cell cycle (Escribano-Diaz et al., 2013), and it involves homology search, strand pairing, strand exchange, and regeneration between homologous DNA molecules. This process not only repairs DSBs but also contributes to genetic variability (Aleksandrov et al., 2020). The entire HR molecular machinery includes DNA damage sensors like the MRN/X complex, which consists of homodimers of MRE11, RAD50, and either NBS1 (Nibrin/NBN in *Homo sapiens*) or XRS2 (in *S. cerevisiae*). This complex plays a crucial role in recognizing and signaling DNA damage and facilitating repair through HR or non-homologous end joining (NHEJ). Upon detecting DNA damage, the MRN complex activates signaling molecules such as the protein kinase ataxia-telangiectasia mutated (ATM), initiating a comprehensive DNA damage response that includes cell cycle arrest (Qiu and Huang, 2021). While the core MRN complex, composed of MRE11 and RAD50, is conserved across all organisms, XRS2 and NBS1 are found exclusively in eukaryotes (Beikzadeh and Latham, 2021; Stracker et al., 2007). MRE11 is the central component of the MRN/X complex, interacting with other complex proteins (RAD50/NBS1/XRS2) and DNA itself (Assenmacher and Hopfner, 2004; Vertemara and Tisi, 2023).

3.1. RAD51: A conserved key player in HR

The RAD51 protein plays a pivotal role in HR, particularly during the process of strand invasion. This recombinase locates and aligns homologous DNA sequences to ensure accurate DNA repair. With the help of RAD51 mediators such as BRCA2 and RAD51 paralogs, RAD51 replaces replication protein A (RPA) and forms a nucleoprotein filament on single-stranded DNA (ssDNA) (Bonilla et al., 2021; Stark et al., 2002; Krejci et al., 2012). This filament facilitates the pairing of the damaged DNA strand with its undamaged homologous counterpart, enabling precise repair. The ATPase activity of RAD51, regulated by its Walker A and B motifs (Symington, 2002), is essential during synapsis, driving the resolution and release of the final repaired product (Chi et al., 2006). In multicellular eukaryotes like humans, oncogene activation during tumorigenesis induces DNA replication stress (RS), driving chromosomal rearrangements linked to cancer. Many RS episodes result from transcription-replication conflicts (TRCs) occurring at the same loci. RAD51 is essential for protecting replication forks under RS by preventing TRCs from causing fork breakage. Regions affected by RAD51 deficiency overlap with loci prone to cancer-related amplification, typically replicated and transcribed in early S-phase. Furthermore, RAD51 recognizes abasic (AP) sites, preventing their accumulation and protecting replication forks from breakage, especially when compensatory mechanisms like POL θ polymerase repair are impaired. This suppression of AP site cleavage by the MRE11-RAD50 complex preserves genomic stability (Bhowmick et al., 2022). RAD51 also directly binds to AP sites using its natural DNA-binding mechanism, with AP sites enhancing its DNA association rate. This prevents uncontrolled AP site processing and accumulation, which otherwise leads to replication fork breakage. These functions are vital, especially when compensatory pathways like POL θ polymerase-dependent gap filling are defective. RAD51 on abasic DNA inhibits MRE11-RAD50-mediated cleavage, highlighting the critical role of RAD51 and BRCA2 in safeguarding DNA integrity from AP site-induced damage, thus maintaining genomic stability (Hanthi et al., 2024).

3.2. RAD51 paralogs: accessory factors and their roles as partners in DNA repair

The RAD51 gene family consists of paralogs, which are related genes

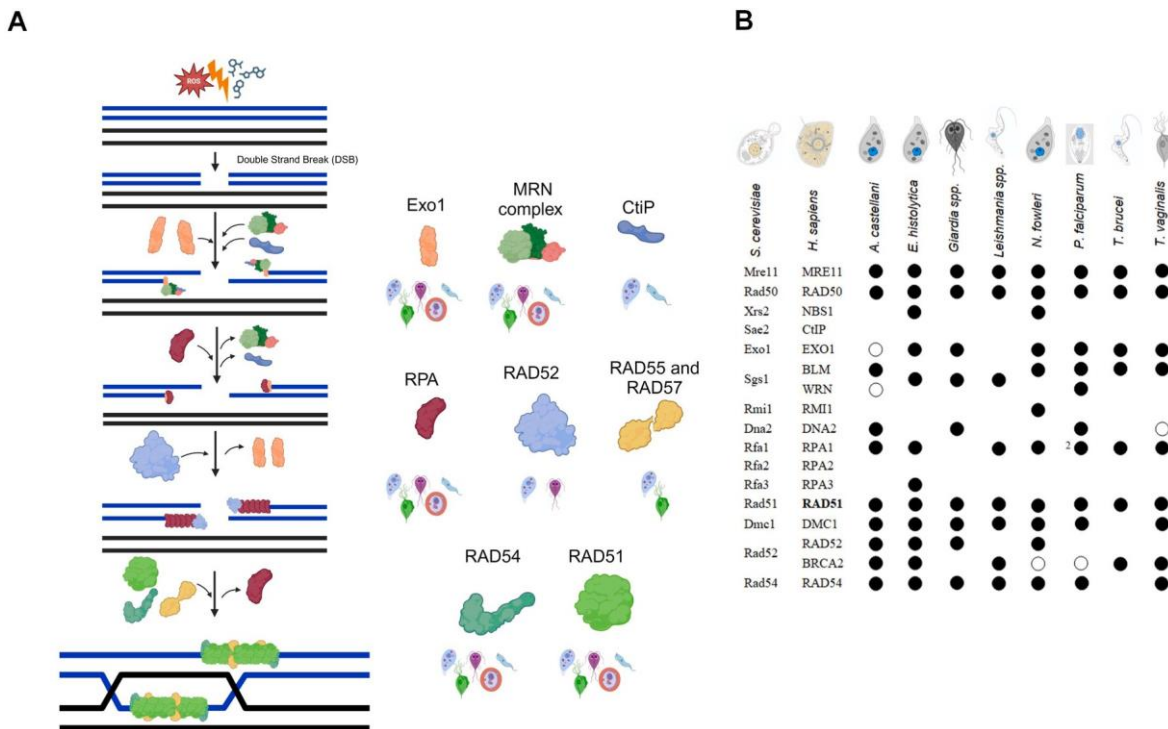


Fig. 1. Distribution of key molecular players involved in DSB homologous recombination in protozoa parasites. (A) Schematic diagram of HR repair mediated by RAD51 and paralogs in protozoan parasites. When a DSB occurs, the DNA undergoes resection, meaning the 5' ends are degraded, leaving exposed 3' single-stranded DNA (ssDNA). These 3' overhangs are initially coated with proteins such as Exo1, the MRN complex (comprising Mre11, Rad50, and Nbs1), and Ctip. After these proteins complete their role, they are replaced by Replication Protein A (RPA), which binds to and stabilizes the ssDNA. RAD51 then displaces RPA, assembling into a nucleoprotein filament around the ssDNA. This RAD51 filament facilitates the search for a homologous sequence by invading the sister chromatid, where it locates the matching sequence required for repair. Once the homology search is successful, RAD51 is displaced, allowing DNA polymerases to synthesize new DNA, effectively using the homologous sequence as a template for accurate repair of the break. This process restores genome integrity by ensuring faithful DNA replication and repair. (B) Occurrence of key molecular players involved in DSB HR in protozoa parasites and, where genome information is available. Black circles identify putative orthologous sequences detected using key molecular players sequences involved in DSB HR from *S. cerevisiae* and/or *H. sapiens*. White circles identify low homology. Numbers denote the number of isoforms present in paralogous gene families and include the putative orthologue. Images created in BioRender. (2024) BioRender.com/q13k294.

that arose through duplication events within the genome. This family is present in many eukaryotes. In *S. cerevisiae*, the complete genome sequence revealed four proteins—RAD51, RAD55, RAD57, and DMC1—that make up the RAD51 paralog family. While RAD51 paralogs share low sequence similarity with each other and with RAD51 itself, they retain key functional elements, such as the Walker A and B motifs, that are essential for their activity. These paralogs play supporting roles in HR, transmitting DNA damage signals and facilitating the repair process. RAD51 is the central protein in HR, but in both humans and yeast, additional paralogs exist that enhance its function. In humans, these include RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, and XRCC3, while in yeast, paralogs like RAD55, RAD57, Csm2, Psy3, Shu1, and Shu2 play similar roles. These proteins are believed to function in HR during meiosis, replication, and DSB repair (Suwaki et al., 2011). In *S. cerevisiae*, RAD51 paralogs such as RAD55 and RAD57 act as accessory factors that assist RAD51 during HR (Cui et al., 1999). Their function appears to be analogous to that of human paralogs XRCC2 and XRCC3, which have been shown to be crucial for radiation resistance through HR (Takata et al., 2000). In *Homo sapiens*, RAD51B participates in the repair of various DNA lesions, including spontaneous DSBs that can lead to chromosomal abnormalities. The RAD55 and RAD57 paralogs also play a critical role in protecting the RAD51 filament from the Srs2 helicase in *S. cerevisiae*, which has anti-recombination activity (Liu et al., 2011). This suggests a regulatory balance between RAD51 filament assembly/disassembly, mediated by RAD55-RAD57, and its disassembly by Srs2, potentially controlling the initiation of HR. Additionally, the Shu complex—composed of Shu2 (a SWIM-domain-containing protein) and

the RAD51 paralogs Csm2, Psy3, and Shu1—plays a vital role in HR by promoting RAD51 recruitment to DNA repair sites (Zhang et al., 2017; Martín et al., 2006). This complex also facilitates sister chromatid exchange, replication restart, and counteracts the anti-recombination activity of the FIGL1 protein (Martino et al., 2019; Matsuzaki et al., 2019). Moreover, it may prevent mutagenesis and cytotoxicity caused by single-strand alkylation lesions (Bonilla et al., 2021). Despite their low sequence similarity, RAD51 paralogs serve as accessory factors that support the central DNA repair protein, RAD51, and are essential in HR by facilitating partner search, filament assembly, and protection from anti-recombination factors.

3.3. Rad51 paralogues in protozoan parasites and their diverse roles: since DNA repair, genetic rearrangement to antigenic variation

Protozoan parasites exhibit a remarkable capacity for antigenic variation, a phenomenon likely driven by genetic rearrangements occurring during DNA break repair. Many protozoan parasites possess RAD51 paralogs involved in HR (Fig. 1A), with RAD51 being one of the most conserved proteins across species such as *Trichomonas vaginalis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma brucei* (Kelso et al., 2017), *Naegleria fowleri*, *Giardia* spp., *Leishmania* spp., and *Plasmodium falciparum* (Fig. 1B). Beyond its role in safeguarding genomic integrity, HR contributes to genomic versatility and plasticity (Akiba et al., 2005). In many pathogenic organisms, HR serves as a strategy for antigenic variation, such as by modulating the expression of antigenic molecules, as surface glycoprotein genes (VSG) in

(caption on next page)

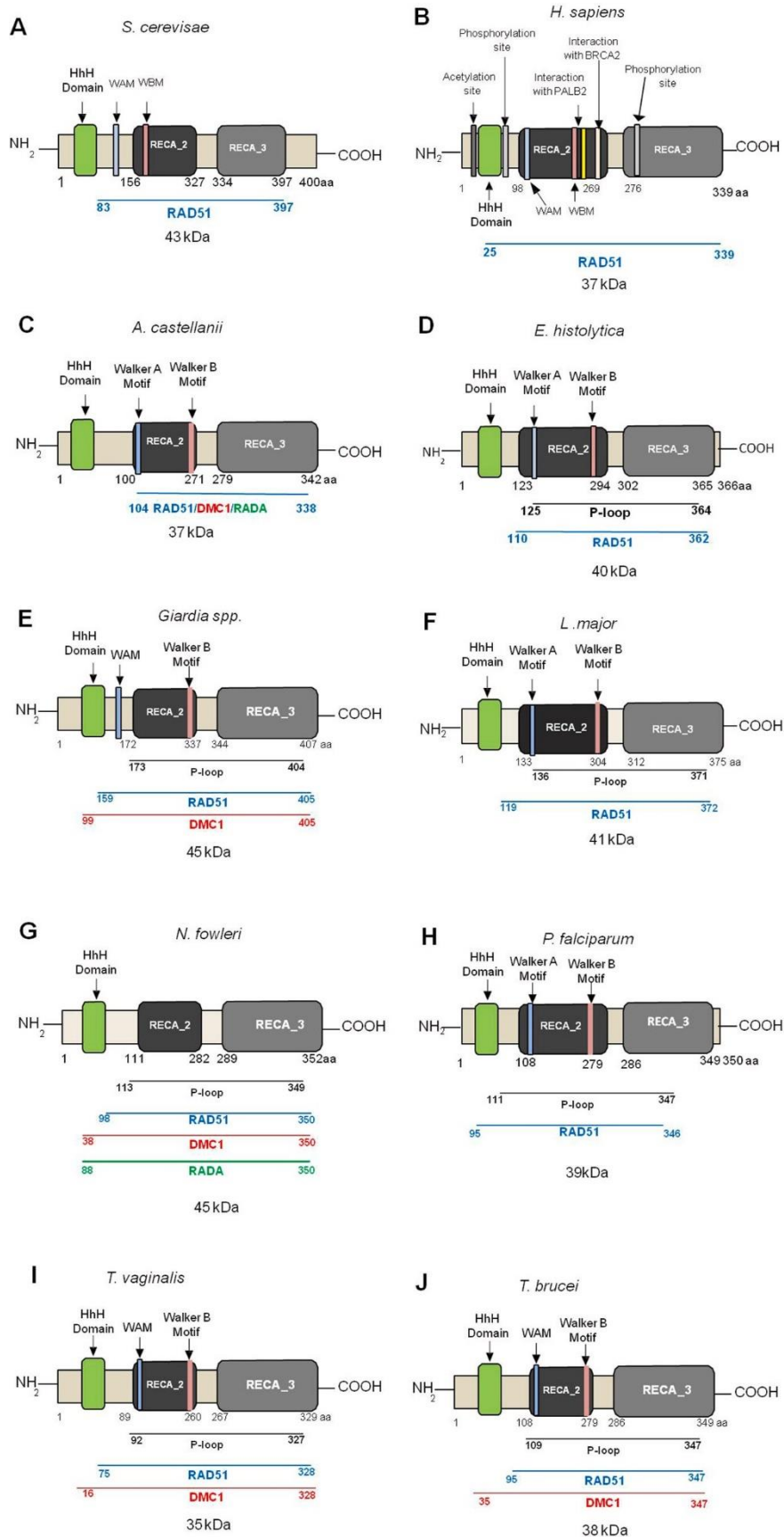


Fig. 2. Recombinase A (Rec A) domains in RAD51 protein in different protozoa parasites. (A) *S. cerevisiae* RAD51, (B) *H. sapiens* HsRAD51 sequences, (C) *A. castellanii* AcRAD51, (D) *E. histolytica* EhRAD51, (E) *G. intestinalis* GiRAD51, (F) *L. major* LRAD51, (G) *N. fowleri* NrRAD51, (H) *P. falciparum* PfRAD51, (I) *T. vaginalis* TvRAD51 AND *T. brucei* TbRAD51 (J). In RAD51 of all the species shown, presents the RECA_2 and RECA_3 domains, as well as the region called RAD51 recombinase. Numbers below of each schematic representation indicate the size of amino acids (aa) for each protein. Square brackets indicate the molecular weight (kDa).

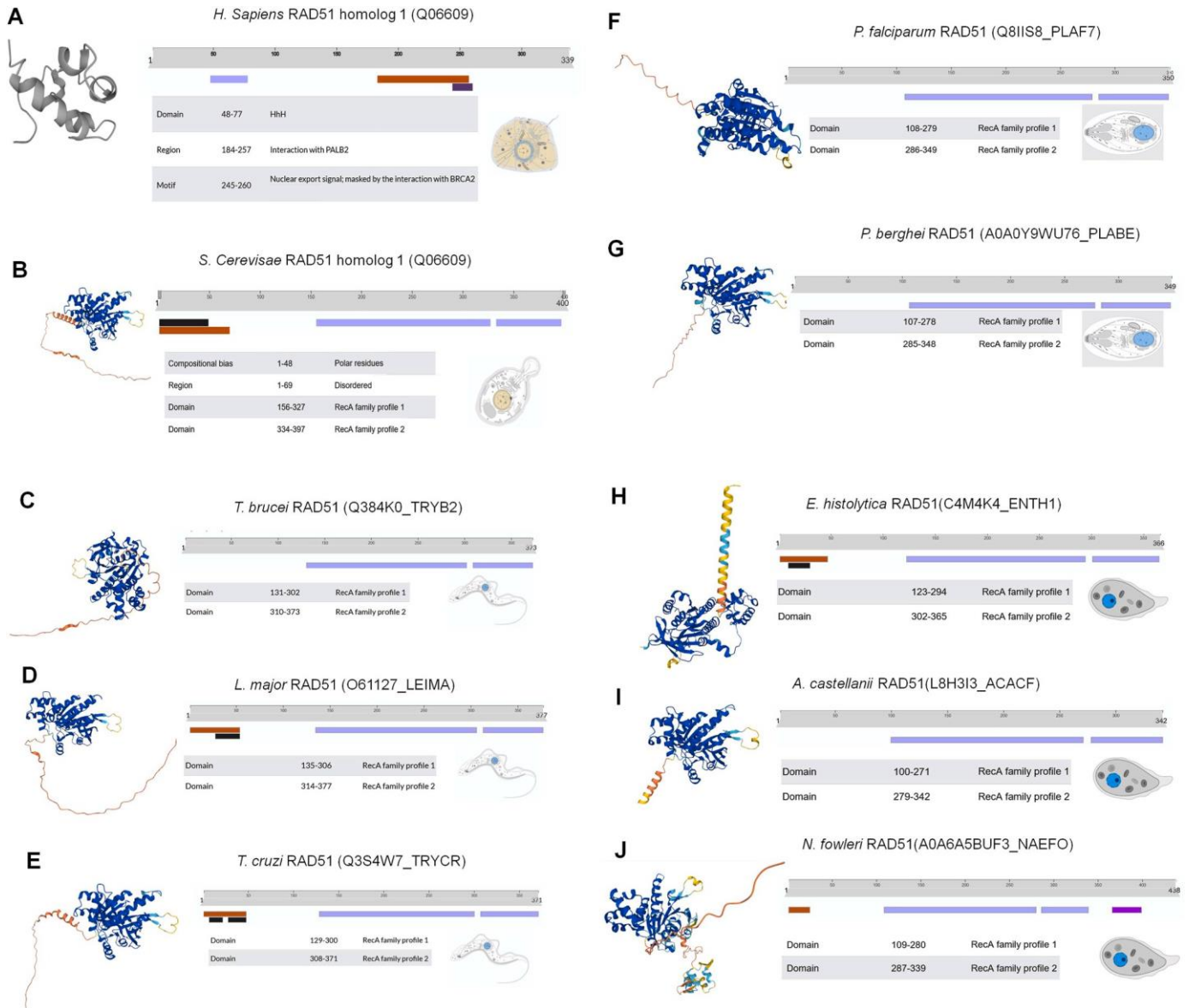


Fig. 3. Data collection representing the inferred by homology of recombinase RAD51 in protozoan parasites (annotated as DNA repair protein RAD51 homolog). Data collections obtained by cross-references representing the inferred homology of the tertiary structure showing the expected recombinase domains RecA (profile 1), RecB (Profile 2) (blue bar) and localization in the nucleus (blue color, inset parasite scheme) of A: *H. sapiens* RAD51 (access: Q06609) showing HhH domain (aa 48–77), a interaction with PALB2 region (aa 184–257) and a nuclear export signal motif (aa 245–260). B: *S. cerevisiae* RAD51 (access: B5VHM3_YEAS6) showing polar residues (aa 1–48), a disorderes region (aa 1–69) and the RecA family profile 1 (aa 156–327) and 2 (aa 334–397). C: RAD51 of *T. brucei* (access: Q384K0_TRYB2), D: *L. major* RAD51 (access: O61127_LEIMA) showing a disordering region (aa 1–53, brown bar) and a compositional bias by polar residues (28–53 aa, black bar). E: *T. cruzi* RAD51 (access: Q3S4W7_TRYCR) with a disordering region (1–47 aa, brown bar), a compositional bias by basic and acidic residues (7–21 aa, first black bar), and a compositional bias by polar residues (28–47 aa, second black bar). F: RAD51 of *P. falciparum* (access: Q8IIS8_PLAF7), G: *P. berghei* RAD51 (access: A0A0Y9WU76_PLABE). H: RAD51 of *E. histolytica* (access: C4M4K4_ENTH1) with a disordering region (1–46 aa, brown bar) and a compositional bias by basic and acidic residues (9–29 aa, black bar). I: *A. castellanii* RAD51 (access: L8H3I3_ACACF) J: *N. fowleri* RAD51 (access: A0A6A5BUF3_NAEFO) with a disordering region (1–24 aa, brown bar), and a ankirine (ANK) repeat (367–369 aa, violet bar) This sequence is preliminary data derived from an EMBL/GenBank/DBJ whole genome shotgun (WGS). In all proteins, the predicted function is to bind to single and double-stranded DNA, DNA-dependent ATPase activity and underwinds duplex DNA. Numbers indicate the length in aa. Complete information of available in UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

trypanosoma, thereby allowing the parasite to evade immune responses and adapt to environmental pressures (Bhattacharyya et al., 2004).

The RecA/RAD51 domain, essential for RAD51’s function, is conserved in parasitic protists (Fig. 2). All species analyzed display the

RECA_2 and RECA_3 domains, alongside the RAD51 recombinase re- gion. In *S. cerevisiae* RAD51 (Fig. 2A) and *H. sapiens* RAD51, two phos- phorylation sites were identified, one near an acetylation site at the N- terminal and the other within the RECA_3 domain, which also harbors

interaction regions for PALB2 and BRC2 located within the RECA_2 domain (Fig. 2B). *A. castellanii* RAD51 presents a simpler structure compared to RAD51 in other species, containing an Walker A and B motifs (ATP-binding motifs) within the RECA_2 domain, and a region identified as RAD51/DMC1/RADA, responsible for its recombinase function (Fig. 2C). RAD51 paralogs from *E. histolytica* (Fig. 2D), *Giardia* spp. (Fig. 2E), *Leishmania* spp (Fig. 2F), *N. fowleri* (Fig. 2G), *P. falciparum* (Fig. 2H), *T. vaginalis* (Fig. 2I) and *T. brucei* (Fig. 2J) possess P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolases. Additionally, *Giardia* (Fig. 2E), *N. fowleri* (Fig. 2G), *T. vaginalis* RAD51 (Fig. 2I) and *T. brucei* (Fig. 2J), and contain a DMC1 recombinase region, while *N. fowleri* RAD51 uniquely possesses a RADA recombinase region (Fig. 2G). Moreover, the N-terminal regions of analyzed parasites structures has a RAD51 Hh domain. *T. brucei* has a particularly broad repertoire of RAD51 paralogs compared to other non-model eukaryotes, each of which plays distinct roles in DNA repair, recombination, and RAD51 subnuclear dynamics. Only the mutation of a single paralog significantly impairs VSG switching (Fig. 3A). Among these, TbRAD51-4 appears less crucial for DNA repair and RAD51 foci formation, suggesting that each paralog performs a specific function within RAD51-dependent HR. The findings indicate that TbRAD51-3 and TbRAD51-5 contribute to DNA repair and recombination, with TbRAD51-3 playing an additional key role in antigenic variation (Dobson et al., 2011). Similarly, *L. infantum* utilizes RAD51 paralogs to regulate gene copy number variation (CNV), a critical mechanism for immune evasion, and promotes HR by stimulating D-loop formation (Genois et al., 2014). In *Leishmania* mutants lacking these paralogs, RAD51 foci formation at DNA damage sites is reduced (Ubeda et al., 2014). The *Leishmania* genome exhibits notable plasticity, with frequent occurrences of aneuploidy, CNVs, and rearrangements facilitated by repetitive DNA sequences, suggesting that HR factors like Mre11, RAD50, BRCA2, and RAD51 paralogs mediate these rearrangements and potentially initiate amplicon formation under stress conditions, such as during drug exposure (da Silva, 2021; Bussotti et al., 2018). In contrast, *L. donovani* primarily utilizes single-strand annealing (SSA) over microhomology-mediated end joining (MMEJ) for DSB repair, as evidenced by CRISPR/Cas9 assays (Zhang and Matlashewski, 2019; da Silva, 2021). Trypanosomes repair DNA damage differently depending on the cell cycle stage. While the relationship between these stages and DNA rearrangements (such as extrachromosomal circles) remains unclear, it has been suggested that HR could play a role in forming these circles. Nevertheless, research shows that even when HR is blocked, linear DNA amplifications can still occur. In *Leishmania major*, LmRAD51 binds to DNA and exhibits DNA-dependent ATPase activity, mediating recombination events between repetitive sequences flanking multidrug resistance (MDR) genes, which leads to the amplification and overexpression of the PGP transporter, conferring a drug-resistant phenotype (McKean et al., 2001) (Fig. 3B). Similarly, *L. infantum* exploits LiRAD51 paralogs to form extrachromosomal circular amplicons, believed to play a role in circumventing drug effects and promoting parasite survival (Genois et al., 2015). HR is closely linked to genome replication, facilitating the repair of DNA damage that could impede DNA synthesis and resolving replication fork stalling. Recent studies raise the possibility that HR may play a central role in *Leishmania* replication. Evidence regarding the essentiality of HR genes remains conflicting, but genome-wide mapping has revealed an unconventional arrangement of DNA replication origins. While loss of any HR factors is not immediately lethal, long-term consequences include DNA damage and the accumulation of cells with abnormal DNA content. Only the loss of RAD51 or RAD51-3 severely affects DNA synthesis and significantly increases genome-wide mutations. The deletion of RAD51, but not RAD51-3, drastically impacts DNA replication by inhibiting initiation at major origins while promoting increased DNA synthesis in subtelomeric regions (Damasceno et al., 2020). Competition assays have demonstrated that LiRAD51 paralogs exhibit a strong affinity for D-loop substrates and single-stranded DNA.

After a DSB, DNA undergoes nucleolytic processing to produce a single-stranded DNA with an overhang that invades the intact sister chromatid, forming joint molecules (D-loops). LiRAD51 paralogs 3, 6, and — 4 exhibit a preference for tailed duplex DNA over single-stranded DNA, suggesting a role in strand invasion (Genois et al., 2015).

3.3.1. Trypanosome VSG switching: RAD51 and DMC1 functions

In *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, RAD51 recombinase (TcRAD51) is present throughout all stages of the parasite's life cycle: epimastigotes, trypomastigotes, and amastigotes. Experimental evidence suggests that TcRAD51 is essential for HR, particularly in repairing oxidative DNA lesions and double-strand breaks. Overexpression of TcRAD51 in epimastigotes results in accelerated recovery from genotoxic treatments such as gamma irradiation and zeocin, as well as increased resistance to hydrogen peroxide and benznidazole (Regis-da-Silva et al., 2006; Cruz-Saavedra et al., 2023) (Fig. 3C). Similar to *T. brucei*, TcRAD51 is also involved in the expression of variant surface glycoprotein (VSG) genes. In *T. brucei*, two HR pathways for VSG switching have been identified: a RAD51-dependent pathway and a less common RAD51-independent pathway (Conway et al., 2002a). Both RAD51-dependent and RAD51-independent mechanisms contribute to antigenic variation and are employed as immune evasion strategies and additionally, the genomes of *T. cruzi* and *T. brucei* encode genes for the DMC1 recombinase, which shares 65% and 70% identity with human DMC1, respectively (Conway et al., 2002b). RAD51 has been shown to interact with RNA-DNA hybrids, which cluster around DNA breaks. Mutations in RAD51 disrupt this co-localization with breaks and appear to affect the abundance of these RNA-DNA hybrids, indicating RAD51's potential role in repairing DNA breaks near specific VSGs (Girasol et al., 2023a; 2023b).

RAD51's involvement in the basal expression of genes throughout the *T. cruzi* life cycle suggests a broader role in cellular processes, with specific signatures of differential gene expression associated with oxidative stress (e.g., RPA, MRE11, NBS1, BRCA2, MND1, and RAD51) and other functions (Cruz-Saavedra et al., 2023). In *T. brucei*, the Rad51-3 paralog appears central to DNA repair, which may explain its crucial role in *Leishmania*. Conversely, Rad51-4, which has lower activity in *Leishmania*, seems to play a lesser role in DNA repair. The Rad51-5 paralog, absent in *Leishmania*, does not interact with Rad51-3, 4, or 6, suggesting it may have evolved a distinct function (Dobson et al., 2011).

The detection of genetic exchange in *T. cruzi* has been a significant challenge in understanding the mechanisms that generate progeny and genetic diversity in this parasite. The incorporation of ohalogenated thymidine analogs facilitates the formation of fused-cell hybrids. Notably, the naturally occurring hybrid strain CL Brener, which exhibits elevated levels of RAD51 and BRCA2 transcripts, showed an increased frequency of fused-cell hybrids. In addition, *T. cruzi* cells overexpressing RAD51 displayed a higher detection of fused-cell hybrids compared to wild-type cells, suggesting that the HR pathway, mediated by RAD51, plays a crucial role in the formation or stabilization of these hybrids. This process likely contributes to the generation of intraspecific variability and environmental adaptability in *T. cruzi* (Alves et al., 2018).

3.3.2. Plasmodium falciparum and the role of RAD51 in HR, antigenic variation, and meiosis

In *P. falciparum*, the malaria-causing parasite, HR is crucial for repairing DSBs. Parasites with mutated or deficient PfRAD51 fail to repair DSBs effectively and exhibit a reduced parasite burden, specifically, a mutation in the Walker-A motif of PfRAD51 (PfRad51K143R) not only abolishes its ATPase activity but also exerts a dominant negative effect, inhibiting the ATPase activity of wild-type PfRAD51 proteins (Roy et al., 2014). PfRAD51, which contains conserved RAD51 recombinase domains and homologous to prokaryotic RADA (Fig. 3D), plays a critical role in

the rapid antigenic variation of surface molecules, enabling the parasite to evade the host's immune system (Vydyam et al., 2023). Additionally, exposure to the DNA-damaging agent methyl methanesulfonate (MMS) has been shown to increase PfRAD51 expression, suggesting its dual role in both DNA repair and antigenic variation (Bhattacharyya & Kumar, 2003).

Interestingly, *P. falciparum* undergoes a meiotic stage within the *Anopheles* mosquito vector, where diploid zygotes undergo meiosis to produce haploid cells (Guttery et al., 2023). Similarly, *Plasmodium berghei*, a rodent malaria parasite, possesses a RAD51 homolog with ATP-dependent DNA damage sensor activity (Fig. 3E). Research on *Plasmodium berghei* has highlighted the pivotal role of DMC1 in meiotic recombination, where PbDMC1-deficient parasites exhibit heightened sensitivity to genotoxic agents and impaired oocyst development (Mlambo et al., 2012). Additionally, in *P. berghei*, RAD51 has been associated with BRCA2, and this interaction is essential for the parasite's life cycle, particularly in facilitating DNA repair and maintaining genome stability during infections in both the mosquito vector and mammalian hosts. These findings suggest that targeting RAD51 and BRCA2 could disrupt parasite development and block transmission (Yoshikawa et al., 2022). The loss of functional RAD51 compromises the parasite's ability to repair DNA through HR, resulting in fewer recombination events among var genes—hypervariable genes with long open reading frames. This reduction in var gene diversification limits the parasite's ability to generate new variations and adapt to the host's immune response (Vydyam et al., 2023).

3.3.3. RAD51 and potential functions beyond DNA repair, implications in asexual parasites

E. histolytica possesses a gene encoding a RAD51-like protein, EhRAD51. The expression of EhRAD51 increases during DNA replication and in response to ultraviolet light exposure, suggesting its role in DNA repair. This protein exhibits recombinase characteristics, binding both single and double-stranded DNA and facilitating homologous strand pairing (López-Casamichana et al., 2008) (Fig. 3F). Despite primarily reproducing asexually, there is some evidence of meiotic events during encystment in *E. histolytica* (Ehrenkauf et al., 2013). Biochemical analysis of EhDMC1 indicates its involvement in DNA unwinding, protein-DNA filament formation, and homologous strand exchange, all crucial for recombination. This evidence suggests that both mitotic and meiotic HR pathways may be present in *E. histolytica*, potentially important for encystation (Kelso et al., 2015).

In *A. castellanii* (Fig. 3G) and *N. fowleri* (Fig. 3H), the roles of RAD51 have yet to be explored, although their genomes encode proteins homologous to *S. cerevisiae* RAD51. *T. vaginalis*, the flagellated protozoan parasite causing trichomoniasis, possesses genes for most core meiotic machinery (27 of 29 main meiotic genes), including the meiotic recombinase TvDMC1, suggesting an established meiotic recombination pathway predating its divergence (Malik et al., 2007). Although no RAD51 homolog has been identified in *T. vaginalis*, a potential protein with ATPase DNA strand exchange activity and recombinase domains has been found (Fig. 3I).

G. intestinalis, a flagellated protozoan parasitizing the human digestive tract, contains two DMC1 genes (GdDMC1A and GdDMC1B) but lacks an identifiable RAD51 gene. However, a preliminary sequence derived from an EMBL/GenBank/DDBJ whole genome shotgun (WGS) might correspond to a potential RAD51 protein (Fig. 3J). Notably, GdDMC1B expression and nuclear localization increase upon exposure to ionizing radiation, suggesting its role in double-strand break repair, akin to RAD51 (Torres-Huerta et al., 2016a,b).

In contrast, *Babesia bovis* has RAD51 orthologues, but this recombinase is not essential for antigenic variation in this parasite (Mack et al., 2020). The roles of RAD51 and DMC1 in *Acanthamoeba castellanii* and *N. fowleri* remain unexplored. Phylogenetic analysis of RAD51 and DMC1 genes from various taxa, including protozoan parasites like *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Entamoeba*, reveals an early

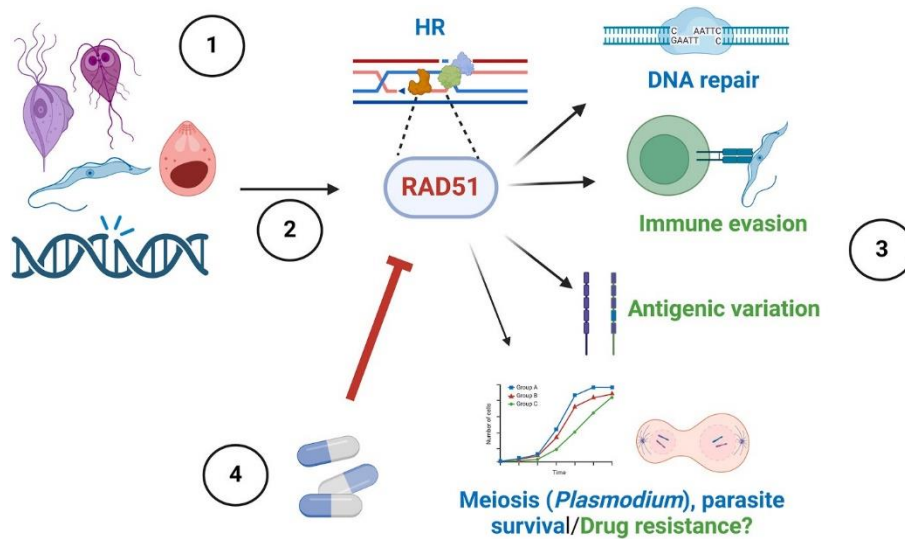
evolutionary divergence between these homologs. This analysis groups them into two distinct clades: the RAD51 clade and the DMC1 clade (Stassen et al., 1997; Bhattacharyya et al., 2004).

A comparative analysis of RAD51 functions and structures between protozoan parasites and other eukaryotes reveals both shared and unique roles in HR. For instance, while *Toxoplasma gondii* and *T. brucei* rely on RAD51 for DNA repair, they show differences in gene targeting efficiency and interaction with HR mediators like BRCA2 (Achanta et al., 2012). In *T. brucei* and *Plasmodium falciparum*, RAD51 is critical for survival under stress, but it also plays unique roles absent in other eukaryotes. *T. brucei* exploits RAD51 for antigenic variation through recombination, a feature less pronounced in yeast or human cells, where RAD51 is highly conserved and central to HR. Structural differences in RAD51 paralogs across species suggest specialized mechanisms, possibly adapted to the survival strategies of unicellular parasites. In addition, while RAD51 orthologs in yeast and human cells have highly conserved roles in HR, protozoan RAD51 appears to mediate recombination with varying efficiency and is integrated with other repair pathways like base excision repair, which may play a more prominent role in these organisms. These differences are likely shaped by evolutionary pressures faced by parasites in surviving host immune responses. An in-depth experimental comparison of structural motifs, recombination efficiency, and interactions with mediators like BRCA2 could provide further insights into these distinctions.

4. RAD51 as a pharmacological target in protozoan parasites

Due to their crucial role in maintaining genetic integrity by repairing DSBs through HR, mediated by RAD51 and DMC1, these recombinases have been considered attractive pharmacological targets for several parasitic diseases (Vydyam et al., 2019; Kelso et al., 2017). The RAD51 recombinase of *T. cruzi* (TcRAD51) is present in all three stages of the parasite's life cycle: epimastigotes, trypomastigotes, and amastigotes. Experimental evidence suggests that TcRAD51 is essential for HR to repair oxidative DNA lesions and DSBs. Overexpression of TcRAD51 in epimastigotes results in faster recovery from genotoxic treatments, such as gamma irradiation and zeocin, and increased resistance to hydrogen peroxide and benzimidazole (Regis-da-Silva et al., 2006). Additionally, TcRAD51 overexpression enhances *T. cruzi* infectivity compared to epimastigotes with basal levels of TcRAD51 or single-knockout epimastigotes for RAD51, which show similar growth rates after hydroxyurea treatment but increased sensitivity to MMS. These findings demonstrate that TcRAD51 levels influence *T. cruzi* sensitivity to genotoxic and oxidative agents and may play a crucial role in the parasite's infectivity (Gomes Passos Silva et al., 2018). The involvement of TcRAD51 in genetic exchange processes has also been identified, as HR can generate new nucleotide combinations, contributing to genetic diversity and, in some cases, cell hybrids (Davila et al., 2011; Passos-Silva et al., 2010). Alves et al. suggest that TcRAD51 is involved in either the formation or stabilization of *T. cruzi* fused-cell hybrids, playing a significant role in generating intraspecific variability and environmental adaptation of this trypanosomatid (Alves et al., 2018). Finally, TcRAD51 has been linked to parasite latency; the *T. cruzi* CL Brener clone with a single RAD51 knockout showed a significant reduction in latent cells, highlighting the role of HR in the latency process (Resende et al., 2020). In *T. brucei*, antigenic variation is a key pathogenic mechanism that enables long-term infections. For instance, TbTRF and TbRAP1, telomere proteins, bind nucleic acids and alter telomere structure integrity, affecting the monoallelic expression of VSG (Li and Zhao, 2021). The absence of TbRAD51 (McCulloch and Barry, 1999), the RAD51-3 paralog (Proudfoot and McCulloch, 2005), or BRCA2 protein (Trenaman et al., 2013) results in less efficient VSG switching (Mehner et al., 2021), making these proteins potential pharmacological targets. In *P. falciparum*, HR is essential for repairing DSBs. Parasites deficient in PfRAD51 or harboring mutated PfRAD51 fail to repair these lesions and exhibit reduced survival. A mutation in the Walker-A motif

Fig. 4.



Expected and unexpected RAD51 functions from protozoan parasites and their use as potential pharmacological targets. Endogenous or exogenous DSB events or DNA damage in protozoan parasites lead to RAD51 activation (1). This recombinase activation is implicated in essential events within the parasites, including the canonical DNA repair mechanism and meiosis (in *Plasmodium*) (shown in blue letters) (2). Additionally, RAD51 has unexpected functions as a mediator of antigenic variation, immune system evasion, parasite proliferation, and potential drug resistance (shown in green letters) (3). These unforeseen functions of RAD51 could be exploited for the development of drugs targeting this recombinase to hinder its effect on pathogens (4). Image created in BioRender. Software, Z. (2024) BioRender. com/q13k294.

(PfRad51K143R) not only abolishes ATPase activity but also exerts a dominant-negative effect by inhibiting the ATPase activity of wild-type PfRAD51 proteins (Roy et al., 2014). Several studies have investigated PfRAD51 as a potential therapeutic target. Vydyam et al. (2019) identified that the compound B02 [3-(phenylmethyl)-2-[(1E)-2-(3-pyridinyl)ethenyl]-4(3H)-quinazolinone] inhibits the ATPase and strand-exchange activities of PfRAD51 and prevents the formation of PfRAD51 foci on damaged DNA, likely by disrupting homomeric interactions of PfRAD51 proteins. B02 inhibited both a drug-sensitive *P. falciparum* strain (3D7) and a multidrug-resistant strain (Dd2) in culture, and its antimalarial activity was found to synergize with artemisinin (ART) and chloroquine (CQ) (Vydyam et al., 2019). Additionally, the antimalarial effect of B02 is enhanced in 3D7 and Dd2 parasites treated with the PfHsp90 inhibitor 17-AAG [17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin], which interacts with PfRAD51 to regulate its stability and promote DSB repair. Inhibition of PfHsp90 reduces PfRAD51 protein levels and increases parasite sensitivity to MMS (Tabassum et al., 2021). The homologous protein PfRAD54 accelerates PfRAD51's catalytic action in the presence of CaCl₂. Furthermore, *P. falciparum* contains two proteins homologous to the bacterial single-stranded binding protein RPA: PfRPA1L, which initiates homologous pairing and strand exchange in vitro, and PfRPA1S. In vivo evidence shows that PfRAD51, PfRAD54, PfRPA1L, and PfRPA1S are required for DSB repair (Gopalakrishnan and Kumar, 2013). Moreover, PfRAD51 and Bloom's helicase (PfBLM) translocate from the nucleus to the mitochondria to repair the extrachromosomal mitochondrial genome during the schizont stage, where it undergoes increased DSBs due to its proximity to the electron transport chain. Overexpression of PfRAD51 and PfBLM accelerates DSB repair, while their inhibition impedes it (Jha et al., 2021). These findings suggest that PfRAD51 could be a viable therapeutic target for malaria. Loss of HR factors does not immediately lethal to *L. major*, but over time it slows cell growth, leads to DNA damage, and results in abnormal DNA content. Also, the loss of RAD51 or its paralogs disrupts DNA synthesis and increases genome-wide mutations and also significantly affects DNA replication by inhibiting initiation at major origins and increasing subtelomeric DNA synthesis (Damasceno et al., 2020), underscoring the critical role of RAD51 in genome replication and its potential as a pharmacological target.

5. Discussion

The role of RAD51, along with its paralogs, is crucial for accurate cell damage signaling and subsequent repair. Given its high conservation across eukaryotes and ubiquitous expression, RAD51 and other HR proteins represent potential therapeutic targets. The clustering of RAD51 and its paralogs from protozoan parasites into two distinct clades, along with the conservation of motifs and domains critical for transducing DNA damage signals to effector molecules and promoting genome repair, indicates their evolutionary divergence. In protozoan parasites, HR not only maintains genomic integrity but also serves as a mechanism to evade the host's immune response through antigenic variation. Despite its importance, the HR pathway in protozoan parasites remains underexplored, and many of the involved enzymes are not yet fully understood. As research progresses, new HR targets that are both fundamental and specific to parasites may be identified, potentially leading to novel therapeutic strategies. Given RAD51's involvement in DNA repair, it is an attractive target for therapeutic intervention in protozoan parasites. However, because RAD51 is also expressed in humans, developing species-specific inhibitors is crucial for targeting this protein effectively without affecting human counterparts. The current lack of detailed structural knowledge of recombinases complicates structure-based drug design. Nonetheless, high-throughput screening of available recombinases might help identify potential drugs that selectively inhibit parasite recombinases. Additionally, well-characterized biochemical assays could serve as secondary studies to elucidate inhibitory mechanisms. Targeting key enzymes in the HR pathway may offer new therapeutic approaches for protozoan parasites that rely on HR for immune evasion and drug resistance (Fig. 4).

CRedit authorship contribution statement

Jose Jesús Flores-Vega: Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Jonathan Puente-Rivera:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Software, Investigation, Formal analysis. **Sharon Itzel Sosa-Mondragón:** Writing – original draft, Software, Investigation. **Minerva Camacho-Nuez:** Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis. **María Elizabeth Alvarez-Sánchez:** Writing – review & editing, Writing –

original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Funding

This work was supported by the Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) awarded to M.E.A.S and the grant of the Colegio de Ciencia y Tecnología for the research project CCYT-2023-IMP-03.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We acknowledge to Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) and the Colegio de Ciencia y Tecnología for the grant CCYT-2023-IMP-03. We appreciate the excellent technical assistance of MsC Laura Vazquez Carrillo.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

- Achanta, S.S., Varunan, S.M., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M.K., 2012. Characterization of Rad51 from apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*: an implication for inefficient gene targeting. *PLoS One* 7 (7), e41925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041925>.
- Akiba, T., Ishii, N., Rashid, N., Morikawa, M., Imanaka, T., Harata, K., 2005. Structure of RadB recombinase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1: an implication for the formation of a near-7-fold helical assembly. *Nucleic acids research* 33 (10), 3412–3423. <https://doi.org/10.1093/nar/gki662>.
- Aleksandrov, R., Rristova, R., Stoynov, S., Gospodinov, A., 2020. The chromatin response to double-strand DNA breaks and their repair. *Cells* 9 (8), 1853. <https://doi.org/10.3390/cells9081853>.
- Alves, C.L., Repolês, B.M., da Silva, M.S., Mendes, I.C., Marin, P.A., Aguiar, P.H.N., Santos, S.D.S., Franco, G.R., Macedo, A.M., Pena, S.D.J., Andrade, L.O., Guarneri, A. A., Tahara, E.B., Elias, M.C., Machado, C.R., 2018. The recombinase Rad51 plays a key role in events of genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*. *Sci. Rep.* 8 (1), 13335. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31541-z>.
- Assenmacher, N., Hopfner, K.P., 2004. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113 (4), 157–166. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0306-4>.
- Balakrishnan, K., Krishnan, N.M., Kulkarni, A., Rao, B.J., 2009. Human Rad51 mediated DNA unwinding is facilitated by conditions that favour Rad51-dsDNA aggregation. *BMC Biochem.* 9 (10), 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-10-2>. PMID: 19133161; PMCID: PMC2630921.
- Barnes, R.L., McCulloch, R., 2007. *Trypanosoma brucei* homologous recombination is dependent on substrate length and homology, though displays a differential dependence on mismatch repair as substrate length decreases. *Nucleic Acids Res.* 35, 3478–3493.
- Beikzadeh, M., Latham, M.P., 2021. The dynamic nature of the Mre11-Rad50 DNA break repair complex. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 163, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.10.007>.
- Bhattacharyya, M.K., Kumar, N., 2003. Identification and molecular characterisation of DNA damaging agent induced expression of *Plasmodium falciparum* recombination protein PfRad51. *Int. J. Parasitol.* 33, 1385–1392.
- Bhattacharyya, M.K., Norris, D.E., Kumar, N., 2004. Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. *Infect. Genet. Evol.* 4 (2), 91–98.
- Bhowmick, R., Lerdrup, M., Gadi, S.A., Rossetti, G.G., Singh, M.I., Liu, Y., Halazonetis, T. D., Hickson, I.D., 2022. RAD51 protects human cells from transcription-replication conflicts. *Molecular cell* 82 (18), 3366–3381.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.07.010>.
- Bonilla, B., Brown, A.J., Hengel, S.R., Rapchak, K.S., Mitchell, D., Pressimone, C.A., Fagunloye, A.A., Luong, T.T., Russell, R.A., Vyas, R.K., Mertz, T.M., Zaher, H.S., Mosammaparast, N., Malc, E.P., Mieczkowski, P.A., Roberts, S.A., Bernstein, K.A., 2021. The Shu complex prevents mutagenesis and cytotoxicity of single-strand specific alkylation lesions. *Elife* 10, e68080. <https://doi.org/10.7554/eLife.68080>.
- Bussotti, G., Gouzouli, E., Boite, M.C., Kherachi, I., Harrat, Z., Eddaikra, N., et al., 2018. *Leishmania* genome dynamics during environmental adaptation reveal strain-specific differences in gene copy number variation, karyotype instability, and telomeric amplification. *mBio* 9, e01399. <https://doi.org/10.1128/mBio.01399-18>.
- Cannan, W.J., Pederson, D.S., 2016. Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. *J. Cell. Physiol.* 231 (1), 3–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.
- Capela, R., Moreira, R., Lopes, F., 2019. An overview of drug resistance in Protozoal diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (22), 5748.
- Chakraborty, S., Schirmeisen, K., Lambert, S.A., 2023. The multifaceted functions of homologous recombination in dealing with replication-associated DNA damages. *DNA Repair* 129, 103548. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103548>.
- Chi, P., Van Komen, S., Sehorn, M.G., Sigurdsson, S., Sung, P., 2006. Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair* 5, 381–391.
- Ciccio, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* 40, 179–204.
- Conway, C., McCulloch, R., Ginger, M.L., Robinson, N.P., Browitt, A., Barry, J.D., 2002a. Ku is important for telomere maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes, in African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 21269–21277.
- Conway, C., Proudfoot, C., Burton, P., Barry, J.D., McCulloch, R., 2002b. Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 45, 1687–1700.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., Leach, D.R., 2001. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular cell* 8 (6), 1163–1174. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00419-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00419-1).
- Cruz-Saavedra, L., Caceres, T., Ballesteros, N., Posada-Forero, B., Ramirez, J.D., 2023. Differential expression of meiosis and homologous recombination-related genes in the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 122 (8), 1747–1757. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07850-2>.
- Cui, X., Brennehan, M., Meyne, J., Oshimura, M., Goodwin, E.H., Chen, D.J., 1999. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat. Res.* 434, 75–88.
- da Silva, M.S., 2021. DNA double-strand breaks: a double-edged sword for trypanosomatids. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 669041. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.669041>.
- Damasceno, J.D., Reis-Cunha, J., Crouch, K., Beraldi, D., Lapsley, C., Tosi, L.R.O., Bartholomeu, D., McCulloch, R., 2020. Conditional knockout of RAD51-related genes in *Leishmania major* reveals a critical role for homologous recombination during genome replication. *PLoS Genet.* 16 (7), e1008828. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008828>.
- Davila, J.I., et al., 2011. Double-strand break repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in *Arabidopsis*. *BMC Biol.* 9, 64. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-64>.
- Dobson, R., Stockdale, C., Lapsley, C., Wilkes, J., McCulloch, R., 2011. Interactions among *Trypanosoma brucei* RAD51 paralogs in DNA repair and antigenic variation. *Mol. Microbiol.* 81 (2), 434–456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07703.x>. Epub 2011 May 26. PMID: 21615552; PMCID: PMC3170485.
- Ehrenkauf, G.M., Weedall, G.D., Williams, D., Lorenzi, H.A., Caler, E., Hall, N., Singh, U., 2013. The genome and transcriptome of the enteric parasite *Entamoeba invadens*, a model for encystation. *Genome Biol.* 26 (7), R77, 14.
- Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al., 2013. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell* 49, 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>. PMID: 23333306.
- Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., Ellisa, J., 2012. Enteric Protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 420–449.
- Genois, M.M., Paquet, E.R., Laffitte, M.C., Maity, R., Rodrigue, A., Ouellette, M., Masson, J.Y., 2014. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 40–73.
- Genois, M.M., Plourde, M., Éthier, C., Roy, G., Poirier, G.G., Ouellette, M., Masson, J.Y., 2015. Roles of Rad51 paralogs for promoting homologous recombination in *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* 11 (5), 2701–2715, 43.
- Girasol, M.J., Krasilnikova, M., Marques, C.A., Damasceno, J.D., Lapsley, C., Lemgruber, L., Burchmore, R., Beraldi, D., Carruthers, R., Briggs, E.M., McCulloch, R., 2023a. RAD51-mediated R-loop formation acts to repair transcription-associated DNA breaks driving antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (48), e2309306120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2309306120>.
- Girasol, M.J., Briggs, E.M., Marques, C.A., Batista, J.M., Beraldi, D., Burchmore, R., Lemgruber, L., McCulloch, R., 2023b. Immunoprecipitation of RNA-DNA hybrid interacting proteins in *Trypanosoma brucei* reveals conserved and novel activities, including in the control of surface antigen expression needed for immune evasion by antigenic variation. *Nucleic acids research* 51 (20), 11123–11141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad836>.
- Gomes Passos Silva, D., da Silva Santos, S., Nardelli, S.C., Mendes, I.C., Freire, A., 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 Neglected Trop. Dis.* 12 (11), e0006875. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875>.
- Gopalakrishnan, A.M., Kumar, N., 2013. Opposing roles for two molecular forms of replication protein A in Rad51-Rad54-mediated DNA recombination in *Plasmodium falciparum*. *mBio* 4 (3), e00252. <https://doi.org/10.1128/mBio.00252-13>.
- Guttery, D.S., Zeeshan, M., Holder, A.A., Tromer, E.C., Tewari, R., 2023. Meiosis in *Plasmodium*: how does it work? *Trends Parasitol.* 39 (10), 812–821. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.07.002>.
- Hanthi, Y.W., Ramirez-Otero, M.A., Appleby, R., De Antoni, A., Joudeh, L., Sannino, V., Waked, S., Ardizzoia, A., Barra, V., Fachineetti, D., Pellegrini, L., Costanzo, V., 2024.

- RAD51 protects abasic sites to prevent replication fork breakage. *Molecular cell* 84(16), 3026–3043.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.07.004>.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28 (5), 739–745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>. PMID: 18082599.
- Her, J., Bunting, S.F., 2018. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks, *Journal of Biological Chemistry*. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>.
- Huang, R.X., Zhou, P.K., 2020. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct. Targeted Ther.* 5 (1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>.
- Jha, P., Gahlawat, A., Bhattacharyya, S., Dey, S., Kumar, K.A., Bhattacharyya, M.K., 2021. Bloom helicase along with recombinase Rad51 repairs the mitochondrial genome of the malaria parasite. *mSphere* 6 (6), e0071821. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00718-21>.
- Kelso, A.A., Say, A.F., Sharma, D., Ledford, L.L., Turchick, A., Sasaki, C.A., et al., 2015. Entamoeba histolytica Dmc1 catalyzes homologous DNA pairing and strand exchange that is stimulated by calcium and Hop2-Mnd1. *PLoS One* 10, e0139399.
- Kelso, A.A., Waldvogel, S.M., Luthman, A.J., Sehorn, M.G., 2017. Homologous recombination in Protozoan parasites and recombinase inhibitors. *Front. Microbiol.* 7 (8), 1716.
- Kirkman, L.A., Lawrence, E.A., Deitsch, K.W., 2014. Malaria parasites utilize both homologous recombination and alternative end joining pathways to maintain genome integrity. *Nucleic acids research* 42 (1), 370–379. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt881>.
- Krejci, L., Altmanova, V., Spirek, M., Zhao, X., 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids research* 40 (13), 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>.
- Li, B., Zhao, Y., 2021. Regulation of antigenic variation by *Trypanosoma brucei* telomere proteins depends on their unique DNA binding activities. *Pathogens* 10 (8), 967. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080967>.
- Li, Y., Mao, P., Basenko, E.Y., Lewis, Z., Smerdon, M.J., Czaja, W., 2021. Versatile cell-based assay for measuring DNA alkylation damage and its repair. *Sci. Rep.* 11 (1), 18393. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97523-w>.
- Lindahl, T., Barnes, D.E., 2000. Repair of endogenous DNA damage, cold spring harbor symposia on quantitative biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 65, 127–133. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>.
- Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H., Heyer, W.D., 2011. Rad51 paralogs Rad55-Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature*. *Nature* 479, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature10522>.
- López-Casamichana, M., Orozco, E., Marchat, L.A., López-Camarillo, C., 2008. Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhrRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Mol. Biol.* 9, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-35>.
- Mack, E.A., Tagliamonte, M.S., Xiao, Y.P., Quesada, S., Allred, D.R., 2020. *Babesia bovis* Rad51 ortholog influences switching of ves genes but is not essential for segmental gene conversion in antigenic variation. *PLoS Pathog.* 31 (8), e1008772, 16.
- Malik, S.B., Pightling, A.W., Stefaniak, L.M., Schurko, A.M., Logsdon Jr., J.M., 2007. An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 6 (3), e2879, 8.
- Martín, V., Chahwan, C., Gao, H., Blais, V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., McGowan, C.H., Russell, P., 2006. Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *EMBO J.* 25 (11), 2564–2574. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601141>.
- Martínez-Espinosa, R., Argüello-García, R., Saavedra, E., Ortega-Pierres, G., 2015. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Front. Microbiol.* 6, 800. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00800>.
- Martino, J., Brunette, G.J., Barroso-González, J., Moiseeva, T.N., Smith, C.M., Bakkenist, C.J., O'Sullivan, R.J., Bernstein, K.A., 2019. The human Shu complex functions with PDS5B and SPIDR to promote homologous recombination. *Nucleic acids research*. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkz738>.
- Matsuzaki, K., Kondo, S., Ishikawa, T., Shinohara, A., 2019. Human RAD51 paralogue SWSAP1 fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase FIGNL1 AAAATPase. *Nat. Commun.* 10 (1), 1407. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09190-1>.
- Mazin Alexander, V., Elena, Zaitseva, Sung, Patrick, Kowalczykowski, Stephen C., 2000. Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing. *EMBO J.* 19 (5), 1148–1156.
- McCulloch, R., Barry, J.D., 1999. A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev.* 13, 2875–2888.
- McKean, P.G., Keen, J.K., Smith, D.F., Benson, F.E., 2001. Identificación y caracterización de un gen RAD51 de *Leishmania major*. *mol. Bioquímica Parasitol.* 115, 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00288-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00288-2).
- Mehner, A.K., Procić, M., Dujeancourt-Henry, A., Hutchinson, S., McCulloch, R., Glover, L., 2021. The MRN complex promotes DNA repair by homologous recombination and restrains antigenic variation in African trypanosomes. *Nucleic acids research* 49 (3), 1436–1454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1265>.
- Mlambo, G., Coppens, I., Kumar, N., 2012. Aberrant sporogonic development of Dmc1 (a meiotic recombinase). Deficient *Plasmodium berghei* parasites. *PLoS ONE*. *PLoS One* 7 (12), e52480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052480>.
- Molinario, C., Martoriati, A., Cailliau, K., 2021. Proteins from the DNA damage response: regulation, dysfunction, and anticancer strategies. *Cancers* 13 (15), 3819. <https://doi.org/10.3390/cancers13153819>.
- Passos-Silva, D.G., et al., 2010. Overview of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J. Nucleic Acids*, 840768. <https://doi.org/10.4061/2010/840768>.

- Proudfoot, C., McCulloch, R., 2005. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res.* 2005 (33), 6906–6919.
- Qiu, S., Huang, J., 2021. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 22 (1), 31–37. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000289>. Regis-da-Silva, C.G., Freitas, J.M., Passos-Silva, D.G., Furtado, C., Augusto-Pinto, L., Pereira, M.T., et al., 2006. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.012>.
- Resende, B.C., Oliveira, A., Guañabens, A., Repolés, B.M., Santana, V., et al., 2020. The influence of recombinational processes to induce dormancy in *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005>.
- Rodgers, K., McVey, M., 2016. Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Physiol.* 231, 15–24.
- Roy, N., Bhattacharyya, S., Chakrabarty, S., Laskar, S., Babu, S.M., Bhattacharyya, M.K., 2014. Dominant negative mutant of *Plasmodium* Rad51 causes reduced parasite burden in host by abrogating DNA double-strand break repair. *Mol. Microbiol.* 94, 353–366. <https://doi.org/10.1111/mmi.12762>.
- Saito, T.T., Colaiácovo, M.P., 2017. Regulation of crossover frequency and distribution during meiotic recombination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 82, 223–234. <https://doi.org/10.1101/sqb.2017.82.034132>.
- Shibata, A., Jeggo, P.A., 2014. DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin. Oncol.* 26, 243–249.
- Stark, J.M., Hu, P., Pierce, A.J., Moynahan, M.E., Ellis, N., Jasin, M., 2002. ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair. *J. Biol. Chem.* 277, 20185–20194.
- Stassen, N.Y., Logsdon Jr., J.M., Vora, G.J., Offenberg, H.H., Palmer, J.D., Zolan, M.E., 1997. Isolation and characterization of rad51 orthologs from *Coprinus cinereus* and *Lycopersicon esculentum*, and phylogenetic analysis of eukaryotic recA homologs. *Curr. Genet.* 31, 144–157.
- Stracker, T.H., Morales, M., Couto, S.S., Hussein, H., Petrini, J.H.J., 2007. The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature* 447 (7141), 218. <https://doi.org/10.1038/NATURE05740>.
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., Sehorn, M.G., 2003. Rad51 recombinase and recombination mediators. *J. Biol. Chem.* 278 (44), 42729–42732. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300027200>.
- Suwaki, N., Klare, K., Tarsounas, M., 2011. RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 (8), 898–905. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.0>.
- Symington, L., 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630–670.
- Tabassum, W., Singh, P., Suthram, N., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M.K., 2021. Synergistic action between PfHsp90 inhibitor and PfRad51 inhibitor induces elevated DNA damage sensitivity in the malaria parasite. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 65 (9), e0045721. <https://doi.org/10.1128/AAC.00457-21>.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albalá, J.S., Swagemakers, S.M., Kanaar, R., Thompson, L.H., Takeda, S., 2000. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombination repair. *Mol. Cell Biol.* 20, 6476–6482.
- Torres-Huerta, A.L., Martínez-Miguel, R.M., Bazán-Tejeda, M.L., Bermúdez-Cruz, R.M., 2016a. Characterization of recombinase DMC1B and its functional role as Rad51 in DNA damage repair in *Giardia duodenalis* trophozoites. *Biochimie* 127, 173–186.
- Torres-Huerta, A.L., Martínez-Miguel, R.M., Bazán-Tejeda, M.L., Bermúdez-Cruz, R.M., 2016b. In silico data analyses of recombinases GdDMC1A and GdDMC1B from *Giardia duodenalis*. *Data Brief* 9, 236–244. B.
- Trenaman, A., Hartley, C., Prorocic, M., Passos-Silva, D.G., van den Hoek, M., Nechyporuk-Zloy, V., Machado, C.R., McCulloch, R., 2013. *Trypanosoma brucei* BRCA2 acts in a life cycle-specific genome stability process and dictates BRC repeat number-dependent RAD51 subnuclear dynamics. *Nucleic Acids Res.* 41, 943–960.
- Ubeda, J.M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J., et al., 2014. Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite leishmania. *PLoS Biol.* 12, e1001868.
- Vertemara, J., Tisi, R., 2023. Dynamic properties of the DNA damage response mre11/rad50 complex. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (15), 12377. <https://doi.org/10.3390/ijms241512377>.
- Vignard, J., Mirey, G., Salles, B., 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother. Oncol. : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 108 (3), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>.
- Vidyam, P., Dutta, D., Sutram, N., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M.K., 2019. A small-molecule inhibitor of the DNA recombinase Rad51 from *Plasmodium falciparum* synergizes with the antimalarial drugs artemisinin and chloroquine. *J. Biol. Chem.* 294, 8171–8183, 294.
- Vidyam, P., Roy, N., Bhattacharyya, M.K., 2023. Uncovering the role of Rad51 in homologous recombination-mediated antigenic diversification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Front. Mol. Biosci.* 10, 1223682. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1223682>.
- World Health Organization. Diarrhoeal disease fact sheet. Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. (Accessed 18