



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA ANIMAL**



**“Participación de la endonucleasa apurínica/apirimidínica
TcAP1 de *Trypanosoma cruzi* en la resistencia a daño oxidativo
sostenido”**

SOLEDAD ALEJANDRA SIERRA CANCINO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: GONZALO CABRERA VALLEJOS

**SANTIAGO – CHILE
2013**

Esta Memoria de Título fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Proyecto Bicentenario Anillo ACT 112, CONICYT, Chile.
- Proyecto FONDECYT 1090124.
- Proyecto FONDECYT 11100053.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Dios por haberme permitido finalizar esta etapa de mi vida con éxito.

A mi familia, a mis padres Teresa y Héctor, a mis hermanos Cristian y Maricela, gracias por el cariño, por ser mi apoyo en todo sentido y además aguantarme, infinitas gracias.

A mi amigo y guía, Rene, y también a su familia, por su apoyo, confianza, cariño, preocupación y dedicación constante hacia a mí, muchas gracias por todo.

A mi mejor amiga Gilda Garrido, por todos estos años de amistad, por confiar en mí, por la infinita paciencia, por los consejos, por las enseñanzas de vida... Gracias Gigi, porque eres en parte la responsable de la persona alegre y feliz que soy ahora.

A mi profesor guía Gonzalo Cabrera, gracias por enseñarme con paciencia todo lo que debía aprender, pero sobre todo gracias porque de ti aprendí que hay que tomarse la vida con humor y que siempre hay que andar con una sonrisa en los labios. Al Dr. Galanti, porque en los peores momentos fue como mi segundo papá, y siempre encontré apoyo en él. A mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer un ambiente alegre de nuestro lugar de trabajo, gracias Sofy por hacerte el tiempo para escucharme y aconsejarme; gracias Naty por tu alegría de siempre; gracias Ivan porque contigo aprendí una maña nueva cada día, gracias, Shago por tus chistes (Shago Meruane), gracias José, Lucy y Paula por los momentos compartidos. Gracias Mariana porque eres una de esas personas difícil de encontrarse en la vida y porque compartimos un cariño muy especial: el amor hacia Dios.

Infinitas gracias a todos!

INDICE

1. ABSTRACT	1
1.1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	3
2.2. Etiología de la Enfermedad de Chagas.....	4
2.3. Formas celulares del parásito.....	5
2.4. Ciclo de Vida de <i>T. cruzi</i>	5
2.5. Vías de Transmisión de la Enfermedad de Chagas.....	6
2.6. Fases de la Enfermedad de Chagas.....	8
2.7. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.....	10
2.8. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.....	11
2.9. <i>T. cruzi</i> y estrés oxidativo.....	12
2.10. Daño oxidativo y reparación del DNA en células eucariontes.....	14
2.11. Hipótesis.....	16
2.12. Objetivo general.....	16
2.13. Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1. Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	17
3.2. Recuento de epimastigotes.....	17
3.3. Transfección de epimastigotes con los plasmidios pTREX-gfp, pTREX-gfp-tcap1.....	17
3.4. Determinación de la expresión de las proteínas GFP y TcAP1-GFP en epimastigotes transfectados mediante ensayos de western blot.....	18

3.5. Generación sostenida de H_2O_2 mediante el sistema glucosa/glucosa oxidasa en cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	19
3.6. Cuantificación de la concentración H_2O_2 generado por el sistema glucosa/GO en cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	19
3.7. Determinación de la viabilidad de parásitos transfectados con los plasmidios pTREX-gfp y pTREX-gfp-tcap1 frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido a diferentes tiempos.	20
3.8. Estadística:.....	20
3.9. Bioseguridad:	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Obtención de epimastigotes recombinantes que expresan la proteína fluorescente verde GFP y la proteína de fusión TcAP1-GFP.....	22
4.2. Cuantificar la concentración de peróxido de hidrógeno generado en medio de cultivo de epimastigotes por el sistema glucosa/glucosa oxidasa (GO) en diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs).	25
4.3. Evaluar la viabilidad de parásitos que sobreexpresan GFP y TcAP1-GFP frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido a diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs).....	26
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIÓN	35
7. REFERENCIAS	36

ÍNDICE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	6
Figura 2. TcAP1-GFP se localiza en un área específica (núcleo) de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	23
Figura 3. Expresión de GFP y TcAP1-GFP en epimastigotes transfectados.	24
Figura 4. Evaluación de la viabilidad de epimastigotes transfectados sometidos a estrés oxidativo sostenido.	26
Tabla 1 Concentración de H ₂ O ₂ (μM) generado con el sistema glucosa-glucosa oxidasa en cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	28

LISTA ABREVIATURAS

AP	Apurínica/apirimidínica
APE1	Endonucleasa apurínica/apirimidínica de <i>Homo sapiens</i> 1
BER	Reparación por escisión de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECG	Electrocardiograma
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FEVI	Fracción de eyección ventrículo izquierdo
GFP	Proteína fluorescente verde
G418	Neomicina
GO	Glucosa oxidasa
HAI	Hemoaglutinación indirecta.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ICBM	Instituto de Ciencias Biomédicas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
INCOSUR	Iniciativa del Cono Sur
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO·	Óxido nítrico
NOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ ⁻	Anión superóxido

OH ⁻	Radical hidroxilo
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
RI	Radiación ionizante
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
Tcl	Linaje I de <i>T. cruzi</i>
TcVI	Linaje VI de <i>T. cruzi</i>
TcAP1	Endonucleasa apurínica/apirimidínica de <i>Trypanosoma cruzi</i> 1
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
UDGasa	Uracil DNA glicosilasa
UV	Radiación ultravioleta

1. ABSTRACT

Oxygen and nitrogen reactive species produced by mammalian and insect hosts induce oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*, diminishing its viability. To repair this damage the parasite activates the base excision repair pathway (BER). In this process, apurinic/aprimidinic (AP) endonucleases play a key role. We determined the viability of *T. cruzi* epimastigotes overexpressing TcAP1 AP endonuclease exposed to persistent oxidative stress.

Achieved by production of H₂O₂ synthesized by a glucose/glucose oxidase system. Using a commercial kit appropriate glucose and glucose oxidase concentrations were established to produce knowing sustained H₂O₂, mimicking host attack to the parasite. Higher viability of parasites overexpressing TcAP1 when submitted to persistent oxidative stress was observed when compared to control.

In conclusion, TcAP1 endonuclease participates in *T. cruzi* survival when parasites are exposed to sustained oxidative damage, similarly to the physiological conditions present in hosts. These results confirm the participation of DNA repair via the BER pathway in parasite persistence in mammalian and in insect vector hosts.

1.1. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) generadas por los hospederos mamíferos y vectores triatominos inducen daño oxidativo en el DNA de *Trypanosoma cruzi*, disminuyendo la viabilidad parasitaria. Para reparar este tipo de daño, este protozoo activa el mecanismo de reparación de escisión de bases del DNA (vía BER). En este proceso juegan un rol fundamental las endonucleasas apurínicas/apirimidínicas (AP). En esta Memoria de Título se determinó la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* que sobreexpresan la AP endonucleasa TcAP1 frente a una exposición sostenida a estrés oxidativo, utilizando el sistema glucosa/glucosa oxidasa que origina H_2O_2 . Usando un kit comercial se establecieron las concentraciones de glucosa y glucosa oxidasa necesarias para producir niveles sostenidos y conocidos de H_2O_2 , simulando la exposición sostenida de *T. cruzi* a agentes oxidantes en ambos hospederos. Este sistema permitió establecer que los epimastigotes que sobreexpresan TcAP1 presentan una mayor viabilidad que parásitos controles, sometidos a estrés oxidativo sostenido.

En conclusión, en esta memoria de título se determinó que la endonucleasa TcAP1 participa en la sobrevivencia de *T. cruzi* en condiciones que simulan la exposición fisiológica sostenida a agentes oxidantes en ambos hospederos. Estos resultados confirman la participación de la vía BER en la persistencia parasitaria en sus hospederos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.

La Enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quien identificó y denominó al agente infeccioso de esta patología como *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz (Apt, 2009). Su importancia en Salud Pública radica en que es una enfermedad crónica que afecta a individuos inmunocompetentes, causando discapacidad (7 a 15% de los pacientes) y finalmente la muerte (Minsal, 2011). Esta patología presenta una amplia distribución en Latinoamérica extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos (35° N.), hasta el sur de Chile y Argentina (34,5° S. en Chile y 45° en la Región de la Patagonia Argentina) (Casanova, 2009). Inicialmente se encontraba confinada al continente americano; sin embargo, se ha extendido a otros continentes, debido, fundamentalmente a fenómenos migratorios de personas infectadas. Actualmente, existen aproximadamente 10-15 millones de personas infectadas en América Latina y aproximadamente 75-90 millones están en riesgo potencial de contraer la infección (Coura, 2007; Higuchi *et al*, 2003; Yun *et al.*, 2009). Por otra parte, se estima que 14.000 personas mueren a causa de la enfermedad cada año en todo el mundo (Martins *et al.*, 2012).

En Chile, la zona endémica se extiende desde la Región de Arica y Parinacota a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, específicamente desde el paralelo 18°30' al 34°36' Latitud Sur. Actualmente, se estima que existen alrededor de 120.000 habitantes infectados (Minsal, 2012), concentrados mayoritariamente en la región de Coquimbo (Minsal 2007). Es una enfermedad considerada un problema social y económico de gran relevancia, ya que afecta principalmente a personas que viven en áreas rurales remotas o en condiciones sanitarias deficientes (Rassi *et al.*, 2010). Esta patología es una infección enzoótica, que se transmite a través de insectos vectores hematófagos reduvídeos de la subfamilia *Triatominae*. Los principales agentes involucrados en la transmisión de *T. cruzi* en Chile son *Triatoma infestans* cuyo ciclo de vida es peridomiciliario y *Mepraia spinolai* que presenta un ciclo de vida silvestre (Apt *et al*, 2008). Recientemente se han descrito dos

especies más de triatominos en el país: *Mepraia gajardoi* que desarrolla un ciclo de vida silvestre localizándose entre los paralelos 18° y 26° S, habitando playas y desiertos costeros de la primera y segunda región (Carvajal *et al.*, 2007) y *Mepraia parapatrica*, que se encuentra en el norte de nuestro país (Minsal, 2012).

En 1991, varios países de América del Sur, incluido Chile, establecieron la Iniciativa del Cono Sur para el control de la enfermedad de Chagas (INCOSUR-Chagas), que proporcionó la estrategia Unidos, consistente en acciones de control y sistemas de información utilizados para evaluar los programas locales de control. Los objetivos específicos de la iniciativa fueron los siguientes: (i) La eliminación de *T. infestans* de las viviendas y su entorno en las zonas endémicas, (ii) La reducción y eliminación de la infestación de las viviendas de otros triatominos presentes en las mismas zonas ocupadas por *T. infestans* y (iii) La reducción y eliminación de la transmisión por transfusión de sangre mediante un estricto control de los bancos de sangre, así como la detección eficaz de los donantes de sangre (Saldaña *et al.*, 2012). La implementación de estos programas en Chile permitió el control de *T. infestans* de los espacios domésticos, y por ende la interrupción de la transmisión vectorial a los seres humanos en 1999 (Lorca *et al.*, 2001). Sin embargo, existen episodios esporádicos de infección vectorial de la enfermedad. Por otra parte, preocupa la presencia de vectores silvestres de la enfermedad, que conlleva nuevos desafíos para el control de las poblaciones de triatominos y, por tanto, para la prevención de la transmisión de *T. cruzi*.

2.2. Etiología de la Enfermedad de Chagas.

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el parásito hemoflagelado *T. cruzi*, perteneciente al orden Kinetoplastida, que se caracteriza por la presencia de un flagelo y una mitocondria que contiene entre un 15 a 30% del DNA celular (De Souza, 2002). Actualmente se describe la existencia de 6 grupos genéticos o linajes de *T. cruzi* que tendrían su origen en hibridaciones generadas a lo largo de la evolución del parásito (TcI a TcVI) (Zingales *et al.*, 2009).

2.3. Formas celulares del parásito.

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* se presenta en cuatro formas celulares: a) tripomastigote (forma extracelular, no replicativa e infectiva): mide aproximadamente veinte micrómetros de longitud y habita tanto en el hospedero mamífero (tripomastigote sanguíneo), como en el insecto vector (tripomastigote metacíclico); b) epimastigote (forma extracelular, replicativa no infectiva): mide de veinte a treinta micrómetros de longitud, presente en el intestino medio del vector triatomino y c) amastigote (forma intracelular replicativa): mide de dos a cuatro micrómetros de diámetro y se aloja fundamentalmente en el citoplasma de macrófagos, células del músculo cardíaco y células del sistema neurovegetativo del tubo digestivo del hospedero mamífero (Vega y Náquira, 2006). Esta última forma se caracteriza por la presencia de un flagelo corto, mientras que epimastigotes y tripomastigotes exhiben un flagelo largo que emerge de la bolsa flagelar, organelo que, junto con el citostoma, está involucrado en las vías endocítica y exocítica del parásito (Ballesteros *et al.*, 2012).

2.4. Ciclo de Vida de *T. cruzi*.

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando el vector triatomino se alimenta de sangre de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes sanguíneos. Estos últimos se transforman, en el intestino anterior del insecto vector, a epimastigotes, los que proliferan y avanzan hacia el tracto digestivo posterior del insecto diferenciándose a tripomastigotes metacíclicos. Cuando el insecto infectado con el parásito se alimenta nuevamente de un mamífero, deposita sus deyecciones (conteniendo los tripomastigotes metacíclicos) sobre la piel del hospedero. Éstos ingresan al torrente sanguíneo facilitado por el rascado de la zona de picadura. En el mamífero, los tripomastigotes pueden invadir diferentes tipos de células, incluyendo macrófagos y fibroblastos. Durante la invasión de la célula hospedera, el tripomastigote es incorporado en una vesícula parasitófora, de la cual logra escapar para diferenciarse en amastigote y replicarse libremente en el citoplasma. Estos últimos se

transforman nuevamente a tripomastigotes que lisan la célula, se liberan al torrente sanguíneo e invaden distintos órganos blanco como corazón y musculatura lisa visceral. El ciclo continua cuando otro vector triatomino se alimenta de la sangre del hospedero infectado (Tyler y Engman, 2001).

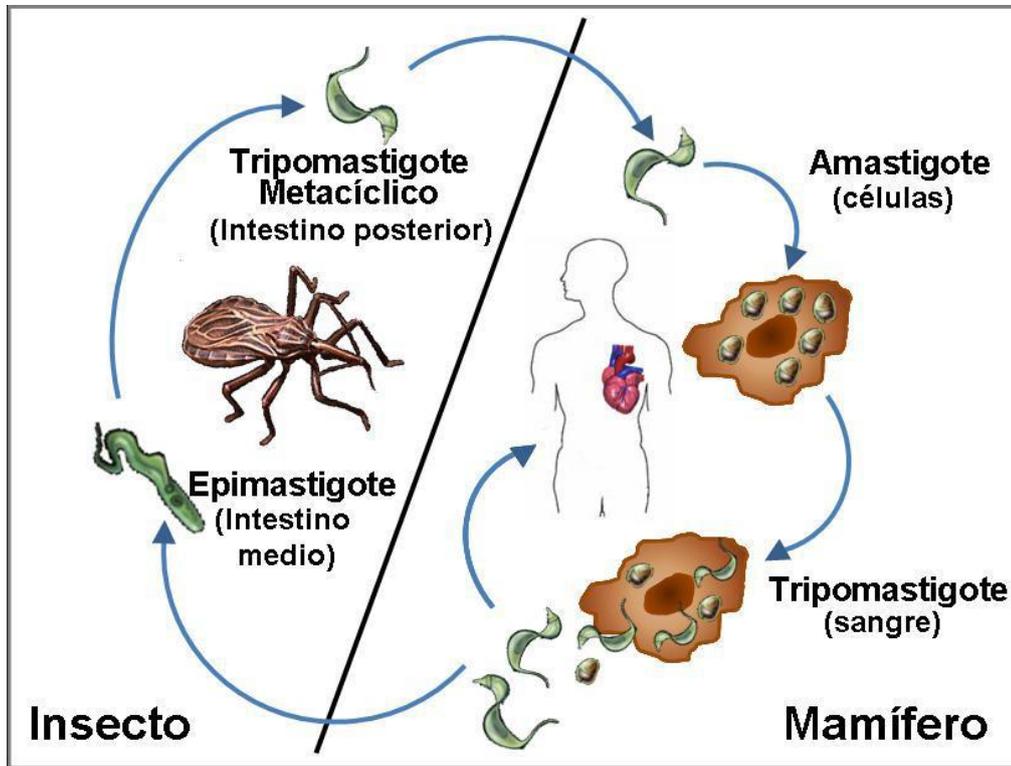


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Vázquez, 2007.

2.5. Vías de Transmisión de la Enfermedad de Chagas.

La vía vectorial representa la forma clásica de transmisión de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas donde se localiza el insecto vector, influenciado fundamentalmente por factores como pobreza, ruralidad, malas condiciones de vivienda, temperaturas altas o moderadas y clima seco. Sin embargo, debido a las políticas de control vectorial aplicadas en Chile y otros países, han adquirido gran importancia otras vías de transmisión no vectorial de la enfermedad tales como transfusión sanguínea, transmisión transplacentaria, transplante de órganos, accidentes de laboratorio y contagio por vía oral (Tyler y Engman, 2001).

La transmisión transplacentaria ha adquirido cada vez más importancia epidemiológica debido a que en parte, es responsable de la globalización de la enfermedad de Chagas, constituyendo de esta forma un problema creciente para la salud pública (Schmunis, 2007). En este tipo de transmisión, el parásito ingresa al feto atravesando la barrera placentaria o infectándolo durante el parto. Un estudio realizado por el Instituto de Salud Pública de Chile en hospitales de las regiones de Coquimbo y Valparaíso reportó que aproximadamente un 6,6% de las madres infectadas con *T. cruzi* transmitieron el parásito a sus hijos (Jercic *et al.*, 2010). A su vez, indagaciones realizadas en mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi* señalan la posibilidad de complicaciones como muerte fetal, muerte neonatal, retraso del crecimiento fetal intrauterino, o parto prematuro (Texeira *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha informado que el riesgo efectivo de transmisión por transfusión de 500 ml de sangre infectada es de 12,5 a 25%. Por tales motivos, a contar del año 1996, se hizo obligatorio el tamizaje de donantes en las regiones endémicas de Chile y, en el año 2008, este procedimiento se extendió a todos los servicios de sangre del país. Con estas medidas, Chile avanza en el objetivo de lograr en el corto o mediano plazo la certificación de la interrupción de la transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas (Minsal, 2011). En relación a la transmisión alimentaria, esta ocurre por la ingestión de alimentos contaminados con parásitos provenientes de deyecciones de triatominos infectados, los que pueden permanecer algunas horas infectantes en ambientes húmedos como leche, jugos de fruta o caña, y patas y/o aparato bucal de vectores mecánicos como moscas y cucarachas (Toso *et al.*, 2011). Otras vías de transmisión descritas son: por lactancia materna, trasplante de órganos desde individuos infectados y accidentes de laboratorio (Minsal 2011).

2.6. Fases de la Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas puede cursar en tres fases progresivas de presentación:

I. Fase aguda: Tiene una duración de seis a ocho semanas aproximadamente (Moncayo y Silveira, 2009). Puede ser debida a la infección primaria o a la reagudización de una infección crónica. La fase aguda generalmente pasa inadvertida, dado que los signos y síntomas son inespecíficos, por lo que suele confundirse con un fuerte resfrío, manifestando fiebre, cefalea, dolores musculares y malestar general. Además, pueden aparecer síntomas locales y sistémicos, pero en general son leves. En algunos casos se presenta el signo de Romaña (edema palpebral unilateral), acompañado o no de linfadenopatía preauricular y/o conjuntivitis. En casos más severos es posible que se presente miocarditis grave, llevando a la aparición de trastornos inespecíficos al electrocardiograma (ECG), como taquicardia sinusal, bajo voltaje del complejo QRS, intervalo PR y/o QT prolongado y repolarización ventricular. También se pueden detectar arritmias ventriculares, fibrilación auricular, signos radiológicos de cardiomegalia y derrame pericárdico detectable a ecocardiografía (Guerrante *et al.*, 2002). Cuando la transmisión es congénita puede asociarse a hemorragias, hepatoesplenomegalia y signos neurológicos, especialmente en recién nacidos prematuros.

II. Fase indeterminada: Puede durar meses, años o décadas. Los pacientes que cursan esta fase de la enfermedad presentan serología y/o análisis parasitológicos positivos para *T. cruzi*, sin evidenciar signos clínicos aparentes. Sin embargo, si el paciente es sometido a pruebas más rigurosas, como ecocardiografía, evaluación autonómica, prueba de esfuerzo, Holter, gammagrafía de perfusión miocárdica, resonancia magnética, cateterismo cardíaco, biopsia endomiocárdica, etc., pueden observarse algunos cambios, generalmente leves (Andrade *et al.*, 2011)

III. Fase crónica: De los individuos que permanecen en la fase indeterminada de la enfermedad, aproximadamente el 30 a 40% manifiestan la

fase crónica, años o décadas después de haber adquirido la infección (Gironés *et al.*, 2004). La fase crónica de la enfermedad es considerada la principal causa de discapacidad (ajustada a años de vida) en adultos jóvenes económicamente activos en países endémicos, lo que genera severas consecuencias económicas, sociales y sanitarias (Martins *et al.*, 2012). Los pacientes con enfermedad crónica sintomática pueden presentar anomalías del tracto gastrointestinal (megaesófago y megacolon) y/o cardíacas (cardiomegalia). Tales mega síndromes son causados, en parte, por el daño ocasionado al sistema nervioso periférico, en particular al plexo mientérico (de Auerbach), plexo submucoso (de Meissner), y fibras nerviosas (Caradonna y Pereira, 2009). Generalmente un 90% de los enfermos crónicos presenta complicaciones de tipo cardíaco, en las que se evidencia un aumento del tamaño de las cavidades del corazón. A nivel celular es posible detectar inflamación crónica con infiltrado de células mononucleares y fibrosis difusa que afecta al sistema de conducción nerviosa y al músculo cardíaco. La sintomatología se evidencia con insuficiencia congestiva, arritmias, accidentes tromboembólicos y muerte súbita, entre otros. La progresión de las arritmias y la miocardiopatía es progresiva, pero una vez que aparece una insuficiencia cardíaca congestiva, la muerte sucede luego de algunos meses (Guerrante *et al.*, 2002).

Aproximadamente un 4,5% de los pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad manifiestan problemas de tipo gastrointestinal o también llamados megasíndromes. Dentro de estas afecciones, el megaesófago (que se presenta como una dilatación esofágica con un grado variable de engrosamiento de la pared muscular, asociado a infiltración mononuclear y fibrosis), es lo más frecuente y el síntoma más común es disfagia, que en casos más graves se acompaña de regurgitación que puede conducir a aspiración alimentaria intermitente, tos crónica, bronquitis y neumonía. Al igual que en megaesófago, cuando se afecta el colon, existe dilatación y engrosamiento de la pared muscular y a medida que la enfermedad progresa, es posible evidenciar un aumento de su tamaño, tanto en longitud como en diámetro. En este último caso, el síntoma característico es el estreñimiento (Guerrante *et al.*, 2002).

2.7. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Para el diagnóstico de laboratorio de la Enfermedad de Chagas se utilizan diversas pruebas con diferentes grados de sensibilidad y especificidad. La aplicación de uno u otro método depende de la fase de la enfermedad (aguda o crónica) en que se encuentre el paciente. Así en etapas iniciales de la infección por *T. cruzi*, caracterizadas por la presencia del parásito en la sangre, se utilizan los siguientes métodos: i) observación microscópica directa de tripomastigotes en la sangre no-coagulada del paciente. El parásito también puede ser visualizado microscópicamente en un frotis sanguíneo mediante tinción de Giemsa. ii) detección indirecta del organismo por xenodiagnóstico, utilizando insectos triatomíneos libres de patógenos (criados en el laboratorio) que se alimentan de la sangre del individuo a diagnosticar. Posteriormente se analiza el tracto intestinal del vector en busca de formas parasitarias. iii) Detección del DNA del parásito en la sangre del paciente mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR).

En cuanto al diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad, las pruebas serológicas, basadas en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*, son generalmente la primera opción, dada la baja parasitemia presente en los pacientes (de Souza *et al.*, 2012). En este caso, el diagnóstico final de la infección parasitaria debe ser confirmado a lo menos mediante dos tests serológicos de principios diferentes. Las pruebas más empleadas son: ensayo inmunoenzimático (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemoaglutinación indirecta (HAI). La sensibilidad y la especificidad de esos tests varían: ELISA y IFI con sensibilidad > 99,5% y especificidad 97-98%. Los tests de HAI presentan sensibilidad de 97-98% y especificidad de 99% (Andrade *et al.*, 2011).

El diagnóstico de miocardiopatía chagásica todavía se basa en criterios sencillos y no específicos, incluyendo un aumento del cociente cardiotorácico (Cociente entre el diámetro del corazón en su punto más ancho y la anchura máxima de la cavidad torácica valorada mediante examen radiográfico, el coeficiente normal es de 1:2) o anomalías en el ECG, como bloqueo completo de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo, bloqueo completo rama izquierda, así como bloqueo en la conducción y alteraciones del ritmo. La

ecocardiografía refinó el diagnóstico de miocardiopatía chagásica mediante la inclusión de criterios de diagnóstico basados en anomalías regionales del movimiento de la pared, reducida fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) <50% y aumento del diámetro telediastólico de dicho ventrículo (> 55 mm). A pesar de ello, la sensibilidad de estos parámetros está lejos de ser perfecta y por lo tanto, se requiere de un modelo de clasificación más preciso, sobre todo para identificar a pacientes con afección cardíaca temprana, que generalmente cursan la forma indeterminada de la enfermedad, ya que un tratamiento precoz y un seguimiento más estrecho puede ser beneficioso para estas personas (García *et al.*, 2010).

2.8. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Los fármacos utilizados durante los últimos 40 años para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterocíclicos como nifurtimox y benznidazol. Sin embargo, su uso es problemático pues pueden generar efectos secundarios en el paciente, su costo es elevado y se ha establecido que algunas cepas parasitarias son refractarias al tratamiento (Wilkinson *et al.*, 2008). Estas drogas tripanocidas cuando son administradas al inicio de la fase aguda de la infección son bastante efectivas, sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre el tiempo de infección. La dosis recomendada de nifurtimox es de 15 mg/kg/día en niños o casos agudos, y de 8 a 10 mg/kg/día en adultos, por 60 días de tratamiento. La dosis diaria debe ser dividida en dosis equivalentes 3 veces al día, vía oral. Sus efectos colaterales más comunes son: anorexia (el más intenso y frecuente), dolor abdominal, náuseas, vómitos y adelgazamiento. Por otra parte, la dosis recomendada de benznidazol es de 10 mg/kg/día en niños o cuadros agudos y 5 mg/kg/día en crónicos, por 60 días, dividida en dos tomas. La dosis máxima diaria recomendada es de 300 mg. Para adultos con peso por sobre 60 kg, el tiempo de tratamiento debe extenderse más allá de los 60 días. El efecto secundario indeseado más común que genera benznidazol es una dermatitis urticariforme (dermatitis por hipersensibilidad) que ocurre hasta en un 30% de los pacientes al final de la primera semana de tratamiento, sin embargo hay

buena respuesta terapéutica a antihistamínicos o corticoides. Cuando se presenta fiebre y adenomegalia se debe suspender el tratamiento, así como también en casos de leucopenia y agranulocitosis. Otros efectos adversos incluyen polineuropatía (generalmente al final del tratamiento de 60 días), con dolor y/o hormigueo en los miembros inferiores, anorexia, etc. Estos fármacos son contraindicados en mujeres gestantes y en casos de insuficiencia renal y hepática. En contaminaciones accidentales como infecciones con instrumentos pérforo-cortantes o por contacto de mucosas con material conteniendo parásitos vivos, muestras para cultivo, vectores, animales de laboratorio infectados, muestras de pacientes sospechosos de elevada parasitemia y material de necropsia, el uso de benznidazol (7-10 mg/kg) es mantenido por un mínimo de 10 días. Si existen evidencias de alta carga parasitaria en este material, el tratamiento debe prolongarse por un mínimo de 30 días. La reagudización de la enfermedad de Chagas puede ocurrir en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, o en coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida. En esta situación, el tratamiento convencional con estos fármacos está indicado por un período de 60-80 días, dependiendo de las condiciones clínicas del paciente (Andrade *et al.*, 2011).

Por los motivos anteriormente expuestos, es fundamental la elaboración de nuevas drogas capaces de eliminar de forma eficiente al parásito, así como más inocuas para el hospedero definitivo.

2.9. *T. cruzi* y estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre agentes oxidantes y defensas antioxidantes de la célula, con predominio de los primeros. Este desbalance es consecuencia de una mayor exposición o generación de radicales libres o una disminución de la expresión y/o actividad de los mecanismos antioxidantes, o ambas situaciones (Dusting y Triggle, 2005; Abilés, 2007). La exposición de células a altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) produce generalmente daño oxidativo de sus diversas macromoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA (Valko *et al.*, 2007).

Las principales ROS son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Aunque el anión superóxido no es una molécula altamente reactiva, su interacción con óxido nítrico (NO^{\cdot}) genera una molécula de alta reactividad, el peroxinitrito ($NOO^{\cdot-}$). Esta última pertenece a las RNS que favorecen el estado de estrés oxidativo. Tanto H_2O_2 como NO^{\cdot} son moléculas altamente difusibles y por lo tanto, pueden interactuar con moléculas distantes dentro de la célula, propagando la oxidación (Zacks *et al.*, 2005; Newsholme *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que ROS/RNS regulan la replicación y supervivencia de *T. cruzi* tanto en células infectadas como en modelos animales de la enfermedad de Chagas (Cardoni *et al.*, 1997). Diversas indagaciones señalan que las tres formas de *T. cruzi* se encuentran normalmente expuestas a ROS/RNS. Así, dentro del intestino de los vectores artrópodos, los epimastigotes se enfrentan a moléculas resultantes de la degradación del grupo hemo que en presencia de H_2O_2 genera radicales $OH^{\cdot-}$ (Graça-Souza *et al.*, 2006). Por otra parte, en el inicio de la infección parasitaria en mamíferos, los tripomastigotes enfrentan la primera línea de defensa del sistema inmune innato, los macrófagos. Los tripomastigotes ingresan a los macrófagos mediante la formación de una vacuola parasitófora, en la cual se encuentran expuestos a la producción de ROS generados por el ensamble del sistema NADPH oxidasa (Hogg *et al.*, 1992) y RNS producido por el metabolismo de L-arginina (Piacenza *et al.*, 2009). Finalmente, otros estudios indican que cardiomiocitos infectados crónicamente con la forma amastigote de *T. cruzi*, presentan un estado de estrés oxidativo permanente (Zacks *et al.*, 2005). Sin embargo, el parásito es capaz de sobrevivir por largos períodos en el tejido cardíaco, determinando la aparición de los signos y síntomas característicos de la enfermedad de Chagas (Piacenza *et al.*, 2009). La formación de ROS/RNS que se genera en el tejido cardíaco infectado es atribuible a dos procesos: un importante grado de infiltrado inflamatorio presente en el miocardio y la disfunción mitocondrial que afecta a los cardiomiocitos parasitados (Gupta, 2009). A pesar de la existencia de mecanismos de defensa antioxidantes presentes en ambos tipos de hospederos, la infección parasitaria no es eliminada completamente, estableciéndose una infección crónica en el caso del hospedero vertebrado (Peluffo *et al.*, 2004).

2.10. Daño oxidativo y reparación del DNA en células eucariontes.

Todos los seres vivos se encuentran constantemente expuestos a agentes exógenos y endógenos capaces de dañar su DNA. Las principales fuentes exógenas corresponden a contaminantes ambientales como la radiación ultravioleta (UV), las radiaciones ionizantes (RI) y algunos productos químicos. Por su parte, los principales factores endógenos, como ROS/RNS, provienen del metabolismo celular (van Loon *et al.*, 2010). Actualmente se han descrito más de 20 tipos de daño a las bases nucleotídicas del DNA luego de la exposición a ROS/RNS en células eucariontes (Slupphaug *et al.*, 2003). Éstas pueden generar importantes alteraciones en el DNA como oxidación de bases nitrogenadas, quiebres de hebras simples y dobles del DNA, así como entrecruzamientos entre DNA y proteínas (Shrivastav *et al.*, 2008; Wiseman y Halliwell, 1996).

Estudios realizados en diversos eucariontes indican que el daño oxidativo que se produce en las bases del DNA, es reparado principalmente mediante la vía de escisión de bases (BER). Este mecanismo es altamente conservado durante la evolución de eucariontes y se activa luego de la detección de daño oxidativo de las bases (Ulbert *et al.*, 2003). La vía BER comienza cuando una DNA glicosilasa reconoce una base dañada y la elimina, generando un sitio abásico apirimidínico/apurínico (AP). Este sitio es sustrato de una enzima endonucleasa AP, que hidroliza el enlace 5' fosfodiéster dejando en el DNA sitios 5' desoxiribosa fosfato y 3'OH, sustrato a su vez para una DNA polimerasa, cuya función es insertar el nucleótido correcto. Finalmente, una DNA ligasa se encarga de sellar el enlace fosfodiéster (Zarkov, 2008).

Actualmente, sólo se ha detectado la presencia de algunos genes involucrados en la vía BER en *T. cruzi*. Se ha descrito la secuencia del gen de APE1 de *T. cruzi* (TcAP1) demostrándose que la complementación de cepas de *E. coli* carentes de exonucleasa III (la principal APE en esta bacteria) con el gen TcAP1 les confiere resistencia frente a agentes oxidantes y alquilantes

(Pérez *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado la presencia y actividad de las proteínas UDGasa (Uracil DNA glicosilasa) y PARP (Faréz-Vidal *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 1998).

Estudios realizados por Cabrera *et al.* (2011) indican que ROS/RNS inducen daño oxidativo en el DNA del núcleo y kinetoplasto de *T. cruzi*, disminuyendo la viabilidad parasitaria. No obstante, una importante proporción de estos parásitos son capaces de sobrevivir, reparando este daño. Además estos autores describen que la inhibición de la actividad de endonucleasas AP de la vía BER de reparación del DNA, utilizando la droga metoxiamina, incrementa la citotoxicidad inducida por ROS/RNS en *T. cruzi*, induciendo apoptosis celular. Por otra parte, Sepúlveda (2012) señala que la sobreexpresión de la endonucleasa AP TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi*, genera una mayor resistencia de los parásitos frente a tratamientos agudos con diferentes concentraciones de H₂O₂ y NOO⁻ durante 30 minutos. Ambas moléculas son altamente inestables y se descomponen rápidamente en solución (Koppenol *et al.*, 1992; Pryor y Squadrito, 1995). Por tales motivos, se han desarrollado sistemas generadores de ROS que permiten mantener *in vitro* concentraciones sostenidas de agentes oxidantes. Uno de estos sistemas se basa en la actividad enzimática de la glucosa oxidasa que convierte la glucosa en ácido D-glucurónico y H₂O₂ (Dockrell and Playfair, 1984; Koslovsky *et al.*, 1997; Rudich *et al.*, 1997).

Como se mencionó previamente, durante su ciclo de vida, las diferentes formas celulares de *T. cruzi* son sometidas a estrés oxidativo sostenido. Así, se ha reportado que epimastigotes y tripomastigotes permanecen varias horas en el intestino anterior de la vinchuca y en la vesícula parasitófora de células macrofágicas, respectivamente (de Carvalho y de Souza, 1989; Graça-Souza *et al.*, 2006). Por su parte, los amastigotes pueden permanecer años en el interior de células cardíacas (Gupta, 2009). Con el objetivo de determinar la importancia de la sobreexpresión de TcAP1 para la sobrevivencia de *T. cruzi* en condiciones que simulen la exposición fisiológica sostenida a agentes oxidantes en ambos hospederos, se planteó la siguiente hipótesis:

2.11. Hipótesis.

La sobreexpresión de la endonucleasa TcAP1 incrementa la sobrevivencia de *T. cruzi* frente a estrés oxidativo sostenido.

2.12. Objetivo general.

Evaluar la participación de la endonucleasa apurínica/apirimidínica TcAP1 de *T. cruzi* en la resistencia del parásito a daño oxidativo sostenido.

2.13. Objetivos Específicos.

1. Obtener epimastigotes recombinantes que expresen la proteína fluorescente verde GFP y la proteína de fusión TcAP1-GFP.
2. Cuantificar la concentración de peróxido de hidrógeno generado en medio de cultivo de epimastigotes por el sistema glucosa/glucosa oxidasa (GO) en diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs).
3. Evaluar la viabilidad de parásitos que sobreexpresan GFP y TcAP1-GFP frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido a diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*.

Epimastigotes de *T. cruzi* (clon Dm28) fueron cultivados a 28°C en medio Diamond (NaCl 0,106 M, KH₂PO₄ 20 mM, K₂HPO₄ 23 mM, triptosa 6,25g/L, triptona 6,25 g/L, extracto de levadura 6,25 g/L, pH 7,2) (Diamond, 1968), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), hemina 75 µM y antibióticos (penicilina 75 U/ml y estreptomina 75 µg/ml).

3.2. Recuento de epimastigotes.

Epimastigotes del clon Dm28 fueron suspendidos en formalina tamponada 3,7% y contados en cámara de Neubauer.

3.3. Transfección de epimastigotes con los plasmidios pTREX-*gfp*, pTREX-*gfp-tcap1*.

Los plasmidios pTREX-*gfp* y pTREX-*gfp-tcap1* fueron generados previamente en el Laboratorio de Biología Celular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile. pTREX-*gfp* es un vector de expresión específico para *T. cruzi* que genera una proteína de fusión con GFP (proteína fluorescente verde). En este caso, se indujo la expresión de la proteína de fusión TcAP1-GFP.

Para la transfección de epimastigotes de *T. cruzi* con los constructos pTREX-*gfp* y pTREX-*gfp-tcap1*, 4x10⁷ epimastigotes en fase exponencial de crecimiento fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS) estéril y suspendidos en 300 µl de buffer de electroporación (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10mM K₂HPO₄, 25mM Hepes, 2mM EDTA, 5mM MgCl₂ a pH7,6). Posteriormente, se agregó 90 ng de cada constructo por separado y se transfectó mediante electroporación a 0.35 kV y 500 µF. Los parásitos transfectados se suspendieron en medio Diamond con SFB al 20% durante veinticuatro hrs y luego se agregó neomicina (G418) a una concentración final de 250 µg/ml para

seleccionar los parásitos que adquirieron el plasmidio. La concentración de G418 se aumentó a 500 µg/ml al tercer día post-transfección y se mantuvo en estas condiciones durante cuatro semanas. La comprobación de la expresión de GFP y TcAP1 fusionada a GFP en los epimastigotes transfectados se realizó mediante observación al microscopio de fluorescencia y por ensayos de *western blot*.

3.4. Determinación de la expresión de las proteínas GFP y TcAP1-GFP en epimastigotes transfectados mediante ensayos de *western blot*.

Proteínas totales de homogeneizados de epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-*gfp* y pTREX-*gfp-tcap1* fueron separados electroforéticamente en geles SDS-PAGE al 10%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) 5% p/v en PBS durante dos hrs a 37° C, lavadas 3 veces con PBS-Tween 0,05% v/v e incubadas con un anticuerpo primario policlonal anti-GFP (Thermo Scientific) en una dilución 1:6000 v/v en PBS-Tween 0,05% o con un anticuerpo primario policlonal anti-TcAP1 en una dilución 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05% durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución 1:10000 v/v en PBS-Tween 0,05% durante una hora a temperatura ambiente. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). La intensidad de las bandas obtenidas fue analizada mediante densitometría utilizando el programa Scion Image 4.0.2 para comparar el nivel de expresión de las diferentes proteínas.

3.5. Generación sostenida de H₂O₂ mediante el sistema glucosa/glucosa oxidasa en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*.

Con el objetivo de generar especies reactivas del oxígeno de manera sostenida e inducir daño oxidativo en el DNA de epimastigotes se utilizó el sistema glucosa/glucosa oxidasa (GO) (Dockrell and Playfair, 1984; Tanaka *et al.*, 1983). Esta enzima tiene como función catalizar la oxidación de la glucosa para formar ácido glucurónico y H₂O₂ (Dockrell and Playfair, 1984; Koslovsky *et al.*, 1997; Rudich *et al.*, 1997). De esta forma, 12x10⁶ parásitos/mL de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento fueron cultivados en medio Grace (Invitrogen®) e incubados con diferentes concentraciones de GO (cero, uno, cinco, diez, veinticinco, cincuenta, setenta y cinco, y cien mU) en presencia de D-glucosa 5 mM, durante dos, cuatro y veinticuatro hrs a 28°C.

3.6. Cuantificación de la concentración H₂O₂ generado por el sistema glucosa/GO en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*.

La concentración de H₂O₂ generado por el sistema glucosa/GO en cultivos de epimastigotes fue cuantificada utilizando el Kit Amplex® Red Hydrogen/Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen®). El reactivo Amplex®Red (10-acetil-3,7-dihydroxyphenoxazine), en presencia de peroxidasa, reacciona con H₂O₂ generando Resofurina, un producto de color rojo, en una relación estequiométrica de 1:1. Brevemente, se preparó una solución A con 4,85 ml de buffer de reacción 1x (fosfato de sodio 0,05 M), 50 µl del reactivo Amplex Red® diluido en dimetilsulfóxido (2,6 µg/µl) y 100 µl de la enzima peroxidasa de rábano (10U/ml). Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se depositaron 50 µl de buffer de reacción 1x, 50 µl del medio de cultivo en el cual se encontraban los epimastigotes sometidos al sistema glucosa/GO y finalmente 50 µl de la solución A recientemente preparada. Paralelamente, se realizó una curva estándar de H₂O₂ (0-5 mM), la que se agregó en vez del medio de cultivo. Las muestras y los estándares fueron incubados durante treinta minutos a temperatura ambiente, manteniendo las placas de 96 pocillos en oscuridad. La absorbancia fue medida en un lector de placas de ELISA a 560 nm.

3.7. Determinación de la viabilidad de parásitos transfectados con los plasmidios pTREX-*gfp* y pTREX-*gfp-tcap1* frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido a diferentes tiempos.

La viabilidad de los parásitos transfectados, expresando las proteínas GFP y TcAP1-GFP, sometidos durante diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs) a estrés oxidativo sostenido, fue determinada a través de ensayos de MTT, el que permite cuantificar la supervivencia y proliferación de células eucariontes (Escobar *et al*, 2010). Esta técnica es dependiente de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial que cataliza la reducción de sales de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) a formazan, un precipitado de color púrpura, cuya absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el medio.

Brevemente, epimastigotes expuestos a estrés oxidativo sostenido durante los tiempos anteriormente mencionados fueron centrifugados a 2000 xg durante 5 min, lavados y suspendidos en 500 µl de medio Grace suplementado con SFB al 20%. Inmediatamente se tomaron 100 µl de cada muestra (en triplicado), se depositaron en placas de 96 pocillos y se adicionó 10 µL de MTT 5 mg/mL en presencia de fenazina metosulfato 0,22 mg/mL. Se realizó una incubación durante cuatro hrs a 28° C y el precipitado de cristales de formazán generado se disolvió agregando 100 µL de SDS al 10% en HCl 0,01 M e incubando durante treinta min a 37° C. Finalmente, la intensidad del color se determinó a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (Thermo scientific).

3.8. Estadística:

Los resultados obtenidos en cada experimento fueron analizados estadísticamente con el software GraphPad Prism versión 5. En todos los casos, los resultados representan el promedio de 3 experimentos ± el error estándar de la media. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones, a fin de determinar diferencias significativas.

3.9. Bioseguridad:

Los experimentos previamente descritos fueron realizados en el laboratorio bajo las normas establecidas por la Unidad de Riesgo y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se trabajó con la forma celular no infectiva del parásito (epimastigote) en un gabinete de bioseguridad clase II tipo A.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de epimastigotes recombinantes que expresan la proteína fluorescente verde GFP y la proteína de fusión TcAP1-GFP.

Los constructos pTREX-*gfp* y pTREX-*tcap1-gfp*, generados y purificados previamente en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Ciencias Biomédicas fueron transfectados mediante electroporación en epimastigotes de *T. cruzi*. La selección de las células transfectadas se realizó incubando los parásitos con el antibiótico G-418 (neomicina) durante tres a cuatro semanas. Para detectar la expresión de GFP sólo y TcAP1-GFP recombinante en los epimastigotes transfectados, se realizaron extendidos de alícuotas de parásitos en portaobjetos, los que posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia. A diferencia de los epimastigotes transfectados con el vector pTREX-*gfp*, donde se detecta fluorescencia verde homogénea a lo largo del citoplasma y flagelo del parásito (figura 2A y C), la emisión de fluorescencia de los epimastigotes transfectados con pTREX-*tcap1-gfp* se encuentra delimitada a un área específica de los parásitos (figura 2B y D). Esta área corresponde al núcleo de *T. cruzi* (Sepúlveda *et al*, 2012).

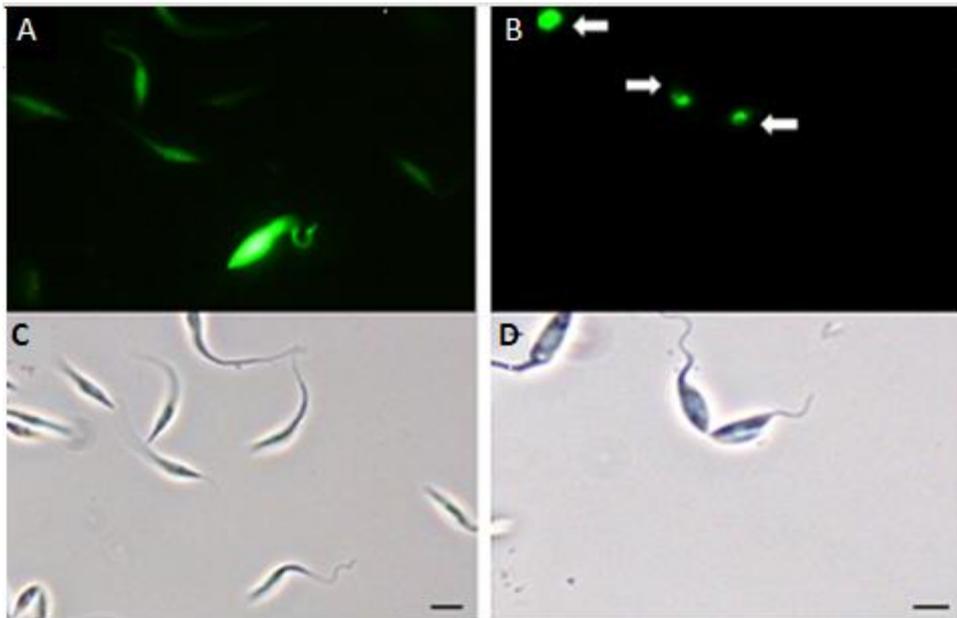


Figura 2: TcAP1-GFP se localiza en un área específica (núcleo) de epimastigotes de *T. cruzi*: Epimastigotes transfectados con el plasmidio vacío pTREX-*gfp* (A y C) y con el plasmidio pTREX-*tcap1-gfp* (B y D) fueron observados al fresco en un microscopio de fluorescencia para determinar la expresión y localización de las proteínas de fusión. A y B: fluorescencia verde. C y D: contraste de fase. Flechas → núcleos. Barra 10µm.

Adicionalmente, la expresión de GFP sola y la proteína de fusión TcAP1-GFP en epimastigotes transfectados fue determinada mediante ensayos de *western blot* en homogeneizados de proteínas totales, utilizando alternativamente un anticuerpo policlonal anti-GFP (figura 3A) o un anticuerpo policlonal anti-TcAP1 (figura 3B), previamente desarrollado en el laboratorio. El carril 1 en ambas figuras corresponde a homogeneizados de parásitos transfectados con el vector pTREX-*gfp*, en tanto el carril 2 corresponde a homogeneizados de proteínas de parásitos transfectados con el constructo pTREX-*tcap1-gfp*. En la figura 3A se aprecia una banda correspondiente a la proteína GFP sola, de aproximadamente 27 kDa (carril 1, flecha verde) y una banda correspondiente a la proteína de fusión TcAP1-GFP (carril 2, flecha negra). Esta última banda presenta una masa molecular de aproximadamente 90 kDa, mayor a la masa esperada (aproximadamente 73 kDa). Sin embargo, una banda de la misma masa (90 kDa) se identifica al realizar el ensayo con un anticuerpo anti-TcAP1 (figura 2B, carril 2), confirmando que se trata de la

proteína de fusión esperada. Por otra parte, en la figura 3B, carriles 1 y 2 se evidencia una doble banda de aproximadamente 50 kDa correspondiente a la proteína TcAP1 endógena (flecha roja). Al realizar una densitometría comparativa entre los niveles de expresión de TcAP1 endógena y TcAP1-GFP se logró establecer que la enzima recombinante asociada a GFP se expresa alrededor de 1,4 veces comparado con el nivel de expresión de la AP endonucleasa endógena (figura 3C). Además se observan otras bandas probablemente por inespecificidad del anticuerpo.

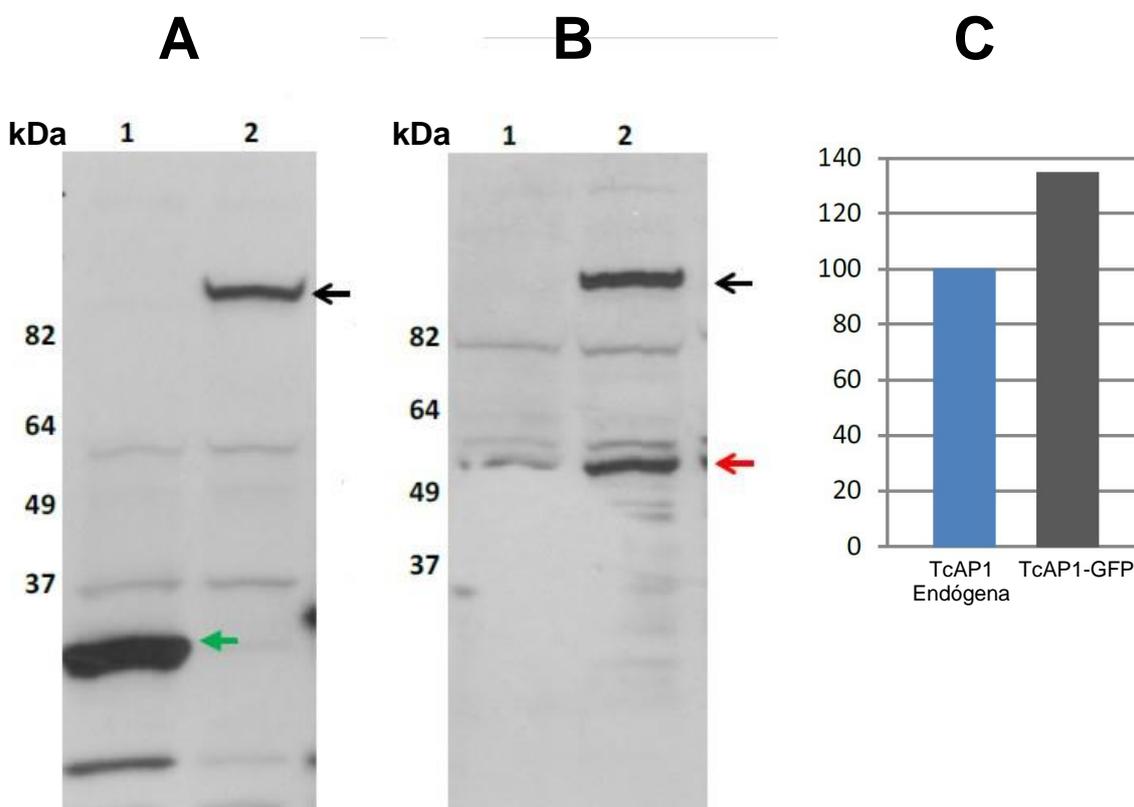


Figura 3: Expresión de GFP y TcAP1-GFP en epimastigotes transfectados. Detección mediante ensayos de western blot de las proteínas recombinantes sobre lisados de epimastigotes transfectados. Identificación de GFP y TcAP1-GFP mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP (A) y un anticuerpo anti-TcAP1 (B). 1: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con el vector pTREX-*gfp*, expresando GFP (←); 2: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con el constructo pTREX-*tcap1-gfp*, expresando TcAP1-GFP (←). Adicionalmente se muestran las bandas correspondientes a TcAP1 (←) endógeno. C: Densitometría comparativa entre los niveles de expresión de TcAP1-GFP (←) y TcAP1 endógena (←).

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que los parásitos transfectados expresan las proteínas deseadas correctamente y, por lo tanto, pueden ser utilizados para desarrollar los experimentos de evaluación de viabilidad frente a estrés oxidativo sostenido.

4.2. Cuantificar la concentración de peróxido de hidrógeno generado en medio de cultivo de epimastigotes por el sistema glucosa/glucosa oxidasa (GO) en diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs).

Como se mencionó previamente, para generar especies reactivas de oxígeno de manera sostenida en cultivos de epimastigotes transfectados se utilizó el sistema glucosa/glucosa oxidasa (GO). Para ello se incubó 12×10^6 /mL de parásitos en medio Grace con concentraciones crecientes de GO (cero, uno, cinco, diez, veinticinco, cincuenta, setenta y cinco, y cien mU) en presencia de D-glucosa 5 mM, durante dos, cuatro y veinticuatro hrs a 28° C. Utilizando el kit Amplex Red Hydrogen/Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen®) se determinó la concentración de H_2O_2 generado en dichos cultivos. Los resultados obtenidos fueron establecidos para cada concentración de GO utilizada a diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs), como se muestra en la tabla 1. Incubaciones con GO 1 mU generan concentraciones de H_2O_2 que varían desde aproximadamente 3 a 11 μ M, dependiendo del tiempo de incubación con la enzima. Este nivel de variación en la concentración de H_2O_2 generado, también se observó al incubar con 5 y 10 mU de la enzima (aproximadamente 20 a 30 μ M de H_2O_2 con GO 5 mU y 45 a 55 μ M de H_2O_2 con GO 10 mU). Sin embargo, a partir de 25 mU y hasta 100 mU de GO, la concentración de H_2O_2 generado se mantiene constante en el orden de 65 μ M, para todos los tiempos. Finalmente, con los resultados obtenidos se procedió a evaluar la viabilidad de parásitos que sobreexpresan GFP y TcAP1-GFP frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido a diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs), utilizando concentraciones de GO de diez, veinticinco, cincuenta y cien mU.

Tiempo (hrs)	Glucosa Oxidasa (mU)							
	0	1	5	10	25	50	75	100
2	4,9 ±1,9	11,1±4,4	24,0±6,2	55,0±3,0	63,5±4,6	61,2±9,3	63,4±3,4	65,9±4,5
4	4,5±1,6	3,6±0,4	29,8±7,4	48,3±2,6	63,9±4,8	64,4±3,4	64,8±4,6	64,4 ±3,2
24	6,3±2,7	5,5±4,1	20,6±3,3	44,5±2,5	64,9±0,3	63,7±1,5	68,0±9,9	63,6 ±0,6

Tabla 1: Concentración de H₂O₂ (µM) generado con el sistema glucosa-glucosa oxidasa en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos fueron incubados a distintos tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs) con 5 mM de D-glucosa y distintas concentraciones de la enzima glucosa oxidasa. La concentración de H₂O₂ fue cuantificada utilizando el kit Amplex Red

4.3. Evaluar la viabilidad de parásitos que sobreexpresan GFP y TcAP1-GFP frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido a diferentes tiempos (dos, cuatro y veinticuatro hrs).

Las cepas transfectadas con el vector pTREX-GFP generan poblaciones no homogéneas entre parásitos que expresan la proteína fluorescente verde (y por consiguiente la endonucleasa TcAP1 fusionada a GFP) y parásitos que no la expresan. Esto ocurre pese a la selección con el antibiótico neomicina. Para conseguir poblaciones homogéneas los epimastigotes transfectados se separaron utilizando citometría de flujo (cell sorter flow cytometry). Con este método, el cultivo alcanzó hasta alrededor de un 95% de parásitos fluorescentes (resultados no mostrados). Estos parásitos fueron utilizados para realizar los ensayos de viabilidad.

Para evaluar si la sobreexpresión de TcAP1 incrementa la viabilidad de *T. cruzi* frente a estrés oxidativo sostenido, parásitos transfectados con pTREX-*gfp* (control) y pTREX-*tcap1-gfp* fueron tratados con D-glucosa 5 mM y GO

(diez, veinticinco, cincuenta y cien mU/mL) durante dos, cuatro y veinticuatro hrs a 28° C. Posteriormente, los epimastigotes se lavaron con medio Grace fresco y se realizó un ensayo colorimétrico MTT para comparar la viabilidad de cada cepa transfectada, bajo las diferentes condiciones experimentales. En la figura 4A se observa que el tratamiento por dos hrs con concentraciones de veinticinco, cincuenta y cien mU de GO determina una disminución de la viabilidad de los epimastigotes que expresan GFP (control). Sin embargo, la sobreexpresión de TcAP1 incrementa de manera estadísticamente significativa la viabilidad de los epimastigotes sometidos a cincuenta y cien mU de GO. Resultados similares se obtuvieron al realizar incubaciones durante cuatro hrs con cien mU de GO (figura 4B) y por veinticuatro hrs con veinticinco, cincuenta y cien mU de GO (figura 4C). Es interesante señalar que, a pesar de que incubaciones con veinticinco, cincuenta y cien mU de GO generan aproximadamente 65 μ M de H₂O₂ de manera constante (Tabla 1), se observa una disminución de la viabilidad de epimastigotes al incubar con concentraciones crecientes de GO desde veinticinco a cien mU. Una posible explicación sería la velocidad inicial en la generación de H₂O₂, el cual se vería incrementado al utilizar mayores concentraciones GO (cincuenta y cien mU).

Se concluye que la sobreexpresión de la AP endonucleasa TcAP1 en epimastigotes de la cepa Dm28c incrementa la viabilidad de parásitos sometidos a estrés oxidativo sostenido.

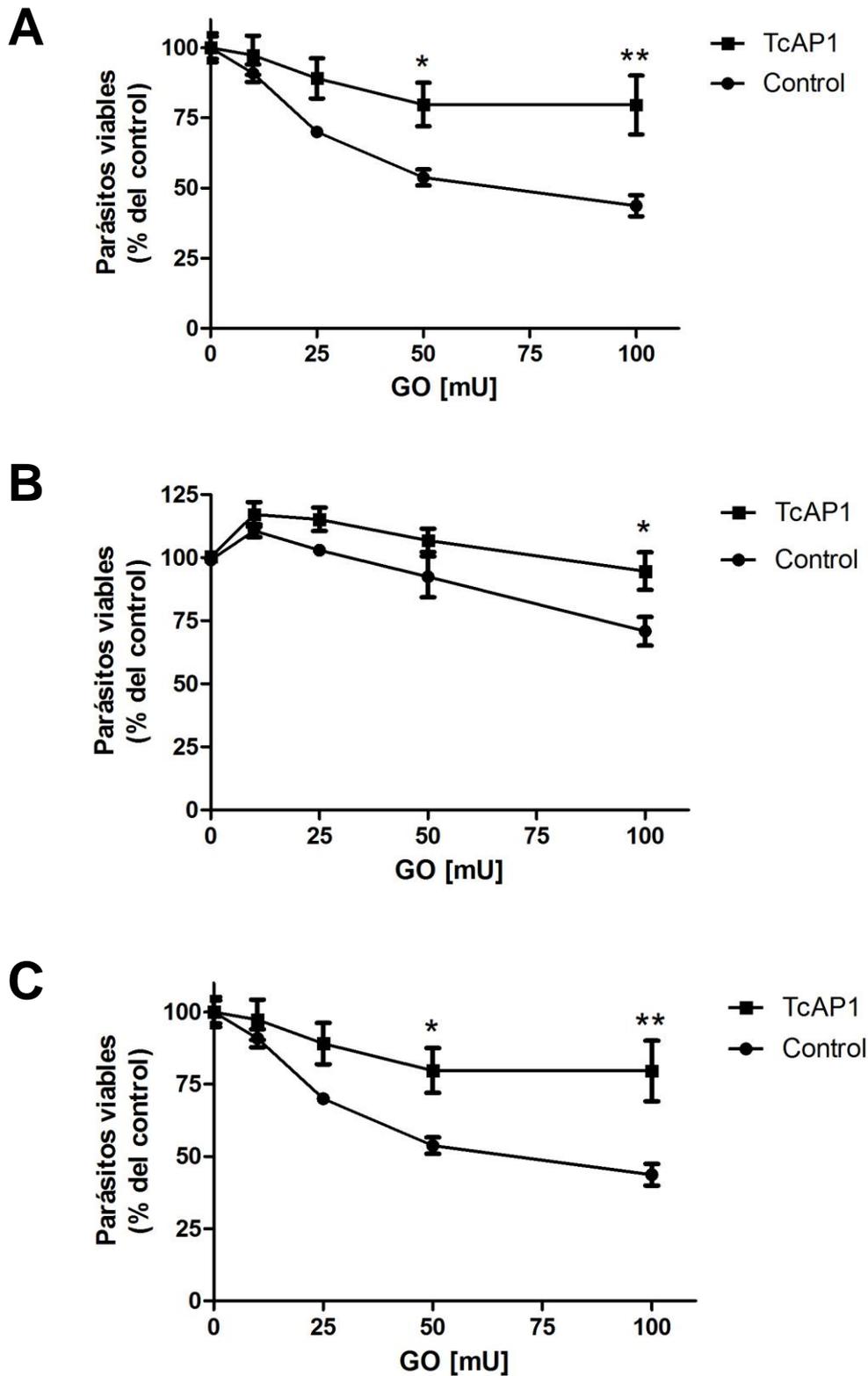


Figura 4: Evaluación de la viabilidad de epimastigotes transfectados sometidos a estrés oxidativo sostenido.

Epimastigotes que sobreexpresan TcAP1 y control fueron tratados durante 2 (A), 4 (B) y 24 (C) hrs con glucosa 5 mM y distintas concentraciones de GO (0,10, 25, 50 y 100 mU). El análisis de viabilidad se realizó mediante ensayos de MTT y comparado mediante ANOVA. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5. DISCUSIÓN

En organismos eucariontes la generación de ROS/RNS en cantidades fisiológicas, juega un papel fundamental en procesos normales de desarrollo y mecanismos de control de transducción de señales que regulan proliferación, diferenciación y muerte celular (Davies *et al.*, 1995; Wiese *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2003). A pesar de que aún no se han identificado moléculas encargadas de transducir señales asociadas a ROS/RNS en *T. cruzi*, se postula que las especies reactivas juegan un importante rol en la adaptación e interacción del parásito con su medio ambiente (Steenkamp, 2002). Experimentos realizados por Finzi *et al.* (2004) señalan que epimastigotes tratados con bajas concentraciones de H₂O₂ (hasta 15 µM) durante 30 min determinan un incremento de la proliferación celular. Estos mismos autores indican que epimastigotes tratados durante 30, 60 o 90 minutos con H₂O₂ 20 µM son capaces de inducir una respuesta adaptativa, incrementando la sobrevivencia parasitaria frente a exposiciones subsiguientes durante 30 minutos con H₂O₂ 100 µM.

Por otra parte, cuando estas especies reactivas son producidas en exceso o por períodos prolongados, pueden ejercer efectos tóxicos, que dañan células y tejidos, alterando procesos fisiológicos normales (Gupta *et al.*, 2009). Tanto ROS como RNS pueden generar daño en carbohidratos, proteínas, lípidos y DNA de diversos organismos y tipos celulares (Valko *et al.*, 2006). En general, cuando estas macromoléculas se ven afectadas por especies reactivas, son eliminadas y re-sintetizadas, a excepción del DNA que necesariamente debe ser reparado para asegurar la viabilidad celular (Slupphaug *et al.*, 2003; Radak *et al.*, 2011). Se ha determinado en células procariontes y eucariontes que la exposición a agentes oxidantes induce daño en el DNA generando lesiones de bases nitrogenadas, formación de sitios abásicos (AP) y quiebres de hebras simple y doble (Slupphaug 2003; Dalhus, 2009; Perez *et al.*, 1999). Estas alteraciones si no son reparadas pueden derivar en mutaciones, errores de transcripción y muerte celular (Gross *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

Estudios realizados en levaduras y diversos metazoos indican que el daño oxidativo que se produce en las bases nitrogenadas del DNA es reparado principalmente por la vía BER, donde las enzimas AP endonucleasas juegan un rol fundamental (Zhang *et al.*, 2008). En *H. sapiens* y otros vertebrados se ha señalado que la AP endonucleasa APE1 es la enzima más importante para el procesamiento de sitios AP, necesario para la reparación del DNA (McNeill y Wilson 2007). Así, en estudios realizados durante el desarrollo embrionario de ratones se ha señalado que la delección del gen que codifica para APE1 murina determina la muerte temprana de los individuos durante la etapa de blastocisto (Xanthoudakis *et al.*, 1996). Igualmente, hasta el momento no ha sido posible obtener líneas celulares carentes de APE1 (Ludwig *et al.*, 1998). En relación a AP endonucleasas de *T. cruzi* se ha descrito la secuencia ortóloga del gen *ape1* de *H. sapiens* (*tcap1*) y se ha demostrado que la complementación de cepas de *E. coli* carentes de *exo III* con el gen que codifica para la proteína TcAP1 les confiere resistencia frente a agentes oxidantes y alquilantes (Pérez *et al.*, 1999). Recientemente se ha determinado que la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* disminuye en presencia de H₂O₂ (200, 350 y 500 μM) o NOO⁻ (200, 500 y 1000 μM) durante 30 min y que este efecto citotóxico es significativamente mayor en parásitos incubados simultáneamente con la droga metoxiamina, un inhibidor de la actividad endonucleasa AP (Cabrera *et al.*, 2011). El rol biológico que presenta TcAP1 en la sobrevida de *T. cruzi* frente a agentes oxidantes queda de manifiesto en experimentos realizados por Sepúlveda (2012) en los que se logró sobreexpresar dicha enzima en epimastigotes. Estos parásitos transfectados fueron expuestos a diferentes concentraciones de H₂O₂ o NOO⁻ durante 30 minutos presentando mayor sobrevida que sus controles. En estos estudios se emplearon concentraciones iniciales conocidas ROS/RNS, sin embargo, se ha descrito que ambas moléculas oxidantes son altamente inestables y se descomponen rápidamente en solución (Koppenol *et al.*, 1992; Pryor y Squadrito, 1995). Así, experimentos realizados por Nakagawa *et al.* (2004) señalan que la vida media del H₂O₂ es de aproximadamente 10 minutos en cultivos de células HeLa (células derivadas de una muestra de cáncer cérvico-uterino) y fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF), la línea celular U937 (proveniente de un linfoma histiocítico humano) por 14 minutos en

cultivos de y de células Jurkat (línea celular inmortalizada de cultivo de linfocitos T) durante 18-20 minutos en cultivos .

Como se mencionó previamente, durante su ciclo de vida, las diferentes formas celulares de *T. cruzi* son sometidas a estrés oxidativo sostenido durante horas, días o meses. En relación a la exposición de epimastigotes a ROS/RNS, existe evidencia que en el interior del intestino anterior de los vectores artrópodos, los parásitos permanecen varios días (Castro *et al.*, 2012; Cortez *et al.*, 2012) y se enfrentan a ROS resultantes de la degradación del grupo hemo (Oliveira *et al.*, 1995; Graça-Souza *et al.*, 2006) que pueden oxidar moléculas de DNA (Aft y Mueller, 1983). Por otra parte, los amastigotes sobreviven por años en el interior de células cardíacas del hospedero mamífero, resistiendo el daño oxidativo de ROS/RNS generado por la presencia de infiltrado inflamatorio de células mononucleares, macrófagos y linfocitos T CD8+, tanto en la fase indeterminada como en la fase crónica de la cardiomiopatía chagásica (Carrasco-Guerra *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1987). La presencia de este infiltrado es acompañada de un incremento en la generación de citoquinas pro-inflamatorias (Pérez-Fuentes *et al.*, 2003) que a su vez pueden incrementar la generación de ROS/RNS (Machado *et al.*, 2000; Zacks *et al.*, 2005). Paralelamente, se ha informado que los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria de cardiomiocitos de ratones infectados con *T. cruzi* presentan una actividad disminuida, que conduce a estrés oxidativo sostenido (Vyatkina *et al.*, 2004; Ide *et al.*, 1999; Wallace, 2000; Chen *et al.*, 2003). Finalmente, en el inicio de la infección parasitaria en mamíferos, los tripomastigotes enfrentan la primera línea de defensa del sistema inmune innato, los macrófagos. Durante la invasión a estas células, los tripomastigotes son incorporados en una vesícula parasitófora en la cual se ensamblan las diferentes subunidades del complejo NADPH oxidasa que genera altas concentraciones de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , proceso denominado “estallido respiratorio” (Piacenza *et al.*, 2009; Hogg *et al.*, 1992). Además, los macrófagos infectados expresan la enzima oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que induce la generación de $NO\cdot$. Esta última molécula difunde desde el citoplasma hacia el interior de la vesícula parasitófora, reaccionando con $O_2^{\cdot-}$, llevando a la formación de $NOO^{\cdot-}$ (Piacenza *et al.*, 2009; Cummings y Tarleton, 2004).

Indagaciones recientes indican que macrófagos no activados e infectados con tripomastigotes son capaces de generar altas concentraciones sostenidas de $O_2^{\cdot-}$ durante 60 a 120 minutos, alcanzando un máximo, en la generación de esta molécula, luego de 10 min post-infección. Sin embargo, la activación de macrófagos con citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, INF- γ e TNF- α conduce a una mayor expresión de la enzima iNOS con la consecuente generación de grandes concentraciones de NO^{\cdot} , la cual se mantiene por al menos 24 hrs (Álvarez *et al.*, 2010; Piacenza *et al.*, 2009). A pesar de que no se conocen las concentraciones de ROS/RNS que son generadas en el interior de la vesícula parasitófora por macrófagos en respuesta a la infección con *T. cruzi*, se estima que la generación sostenida de $O_2^{\cdot-}$ en el fagosoma de este tipo de células infectadas con *Salmonella typhimurium* es de aproximadamente 100 μ M (Craig y Slauch, 2009; Korshunov e Imlay, 2002).

Para generar concentraciones sostenidas de ROS e imitar lo que ocurre durante el estallido respiratorio de macrófagos desde hace décadas se utilizan diversos sistemas enzimáticos. Dentro de los más utilizados se encuentra el sistema xantina-xantina oxidasa que genera concentraciones sostenidas de $O_2^{\cdot-}$ (Tanaka *et al.*, 1983). Por otra parte, también ha sido ampliamente utilizado un sistema basado en la actividad enzimática de la enzima GO que convierte la glucosa en ácido D-glucurónico y H_2O_2 (Tanaka *et al.*, 1983; Dockrell y Playfair, 1984; Koslovsky *et al.*, 1997; Rudich *et al.*, 1997).

Con el objetivo de determinar la importancia de la sobreexpresión de TcAP1 para la sobrevivencia de *T. cruzi* en condiciones que simulen la exposición fisiológica sostenida a agentes oxidantes en sus hospederos, en esta Memoria de Título se estandarizó el sistema glucosa-GO utilizado previamente por Tanaka *et al.* (1983) en cultivos de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. Para ello, en primer lugar, se transfectaron epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento con los constructos pTREX-*gfp* y pTREX-*tcap1-gfp* y se verificó la expresión de GFP (control) y TcAP1-GFP en estos parásitos. Posteriormente, se estandarizaron las concentraciones de GO y glucosa necesarias para generar una concentración constante de H_2O_2 en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, de acuerdo a experimentos publicados previamente (Tanaka *et al.*, 1983; Dockrell and Playfair, 1984; Koslovsky *et al.*, 1997; Rudich

et al., 1997). Se utilizaron rangos de entre 1 a 100 mU de GO y concentraciones de 5 mM de D-glucosa. Finalmente, se estableció que en cultivos de epimastigotes este sistema genera concentraciones constantes durante veinticuatro hrs de aproximadamente 20 a 30 μM de H_2O_2 al utilizar GO 5mU, 45 a 55 μM de H_2O_2 con GO 10mU y 65 μM de H_2O_2 con GO 25, 50 y 100 mU.

Con las concentraciones de GO y glucosa estandarizadas para la generación sostenida de H_2O_2 en cultivos de epimastigotes se procedió a realizar ensayos *in vitro* destinados a comparar la viabilidad de epimastigotes transformados con pTREX-*gfp* y pTREX-*tcap1-gfp*, sometidos a este sistema. De esta manera se estableció que la sobreexpresión de 1,4 veces en la expresión de la enzima AP endonucleasa TcAP1 en epimastigotes incrementa la sobrevivencia de *T. cruzi* frente a estrés oxidativo sostenido de 65 μM H_2O_2 luego de dos, cuatro y veinticuatro horas. Si bien las diferencias generadas no son significativas en todos los puntos, muestran una marcada tendencia hacia un incremento en la sobrevivencia de los parásitos transfectados en comparación con los controles. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por Sepúlveda (2012) en los que demuestra que la sobreexpresión exógena de TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi* conlleva un aumento de la viabilidad de epimastigotes sometidos a diferentes concentraciones iniciales de H_2O_2 durante 30 min.

Los resultados aquí obtenidos, sumados a lo ya descrito por Cabrera *et al.* (2011) y Sepúlveda (2012) confirman que la vía BER se activa en *T. cruzi* frente al daño oxidativo al DNA. Esta y otras vías de reparación del daño oxidativo al DNA, en conjunto con mecanismos celulares antioxidantes, interactuarían permitiendo la sobrevivencia de *T. cruzi* al estrés oxidativo en el triatomino y en los hospederos mamíferos, perpetuando la infección y derivando en la patología chagásica.

En resumen en esta Memoria de Título se ha demostrado que: a) La transfección de los epimastigotes con los plasmidios pTREX-*gfp* y pTREX-*gfp-tcap1* deriva en la expresión de las proteínas GFP y TcAP1 en *T. cruzi*; b) El sistema glucosa-GO en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* genera una concentración sostenida de H_2O_2 durante al menos 24 hrs; c) La endonucleasa

apurínica/apirimidínica TcAP1 participa de manera activa en la reparación del DNA del parásito frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido, aumentando la viabilidad del parásito.

6. CONCLUSIÓN

Se concluye que las moléculas asociadas al mecanismo de reparación del daño oxidativo del DNA en *T. cruzi*, particularmente las AP endonucleasas específicas del parásito, constituyen un posible blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, apuntando al desarrollo de fármacos quimioterapéuticos diferenciales dirigidos contra *T. cruzi*, que no afecten al humano y que sean capaces de inhibir dichas enzimas, potenciando el efecto citotóxico del daño oxidativo al DNA generado por las células del hospedero.

7. REFERENCIAS

AFT RL AND MUELLER GC. Hemin-mediated DNA strand scission. *J Biol Chem.* 1983 Oct 10; 258(19):12069-72.

ALVAREZ MN, PELUFFO G, PIACENZA L, RADI R. Intrapagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem.* 2011 Feb; 286(8):6627-40. Epub 2010 Nov 23

ANDRADE JP, MARIN NETO JA, PAOLA AA, VILAS-BOAS F, OLIVEIRA GM, BACAL F, BOCCHI EA, ALMEIDA DR, FRAGATA FILHO AA, MOREIRA MDA C, XAVIER SS, OLIVEIRA JUNIOR WA, DIAS JC. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol.* 2011 Jun; 96(6):434-42.

APT W, HEITMANN I, JERCIC MI, JOFRÉ L, MUÑOZ P, NOEMÍ I, SAN MARTÍN AM, SAPUNAR J, TORRES M, ZULANTAY I. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infect.* 2008 Jun; 25(3): 189-193.

APT W. Centenario del descubrimiento de Carlos Chagas (1909-2009). *Rev. Iber-latinoam. Parasitol.* 2009;(1):92-94.

BALLESTEROS-RODEA G, SANTILLAN M, MARTÍNEZ-CALVILLO S, MANNING-CELA R. Flagellar Motility of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012; 520380..

CABRERA G, BARRÍA C, FERNÁNDEZ C, SEPÚLVEDA S, VALENZUELA L, KEMMERLING U, GALANTI N. DNA repair ber pathway inhibition increases cell death caused by oxidative dna damage in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem.* 2011; DOI: 10.1002/jcb.23138

CARADONNA K. AND PEREIRA M. Preferential Brain Homing following Intranasal Administration of *Trypanosoma cruzi*. Infect. And Immun. 2009 Apr; 77(4): 1349-1356. ISSN: 1098-5522.

CARDONI RL, ANTUNEZ MI, MORALES C, NANTES IR. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 1997 Mar; 56(3):329-334.

CARRASCO-GUERRA HA, PALACIOS-PRÜ E, DAGERT DE SCORZA C, MOLINA C, INGLESSIS G, MENDOZA RV. Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. Am Heart J. 1987 Mar; 113(3):716-24.

CARRILERO B, MURCIA L, MARTINEZ-LAGE L, SEGOVIA M. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. Rev Esp Quimioter 2011;24 (3): 123-126

CARVAJAL A, ORELLANA J, WIGANT W, BÓRQUEZ C, LOBATO I. Prevalencia de triatominos infectados con *Trypanosoma cruzi* en el litoral de la ciudad de Arica. 2007; 62(3-4): 118-121.

CASANOVA, D. 2009. Cartas. *Rev Panam Salud Publica.* 25(3):280-281. ISSN 1020-4989. http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S1020-9892009000300012&script=sci_arttext

CASTRO DP, MORAES CS, GONZALEZ MS, RATCLIFFE NA, AZAMBUJA P, GARCIA ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. PLoS One. 2012; 7(5):e36591. Epub 2012 May 4.

- CHEN Q, VAZQUEZ EJ, MOGHADDAS S, HOPPEL CL, LESNEFSKY EJ.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36027-31.
- CORTEZ MR, PROVENÇANO A, SILVA CE, MELLO CB, ZIMMERMANN LT, SCHAUB GA, GARCIA ES, AZAMBUJA P, GONZALEZ MS.** Trypanosoma cruzi: effects of azadirachtin and ecdysone on the dynamic development in *Rhodnius prolixus* larvae. *Exp Parasitol.* 2012 Jul; 131(3):363-71. Epub 2012 May 22
- COURA, J.R.** Chagas disease: What is know and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.
- CRAIG M AND SLAUCH JM.** Phagocytic superoxide specifically damages an extracytoplasmic target to inhibit or kill Salmonella. *PLoS One.* 2009; 4(3):e4975. Epub 2009 Mar 23.
- CUMMINGS K.L. AND TARLETON R.L.** Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 2004 Jul; 72, 4081-4089.
- DALHUS B, LAERDAHL JK, BACKE PH, BJØRÅS M.** DNA base repair – recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Nov; 33(6): 1044–1078. Epub 2009 Jul 3
- DAVIES JM, LOWRY CV, DAVIES KJ.** Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Feb 20; 317(1):1-6.
- DE CARVALHO TM AND DE SOUZA W.** Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct.* 1989 Aug;14(4):383-92
- DE SOUZA W.** Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical design.* 2002; 8(4): 269-285.

DOCKRELL HM AND PLAYFAIR JH. Killing of *Plasmodium yoelii* by Enzyme-Induced Products of the Oxidative Burst. *Infection and Immunity*. 1984 Feb; 43(2):451-456.

DUSTING GJ, TRIGGLE C. Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. *Vascular Health and Risk Management*. 2005;1(2) 93–97

FÁREZ-VIDAL M.E, GALLEGGO C, RUIZ-PÉREZ L.M. AND GONZÁLEZ-PACANOWSKA D. Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 2001 Apr 1; 29(7): 1549-1555.

FINZI JK, CHIAVEGATTO CW, CORAT KF, LOPEZ JA, CABRERA OG, MIELNICZKI-PEREIRA AA, COLLI W, ALVES MJ, GADELHA FR. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Jan; 133(1):37-43.

GARCIA-ALVAREZ A, SITGES M, PINAZO MJ, REGUEIRO-CUEVA A, POSADA E, POYATOS S, ORTIZ-PÉREZ JT, HERAS M, AZQUETA M, GASCON J, SANZ G. Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Sep 21; 4(9). pii: e826.

GIRONÉS N, CUERVO H, FRESNO M. Is there a pathogenic role of autoimmune responses in Chagas' disease? *Inmunología*. 2004 Apr—Jun;23 (2): 185-199

GRAÇA-SOUZA A.V, MAYA-MONTEIRO C, PAIVA-SILVA G.O, BRAZ G.R, PAES M.C, SORGINE M.H, OLIVEIRA M.F. AND OLIVEIRA P.L. Adaptations against heme toxicity in bloodfeeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006 Apr; 36, 322-335.

GROS L, SAPARBAEV MK, LAVAL J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. [Oncogene](#). 2002 Dec 16; 21(58):8905-8925.

GUERRANTE R, WALKER D, WELLER P. Enfermedades infecciosas tropicales. Capitulo 66. Tripanosomiasis Americana (enfermedad de chagas). Elsevier España, S.A. 2002 Jun 15; 3rd ed. 387-388. ISBN 84-8174-618 5

GUPTA S, WEN J, AND GARG N. *Review Article. Oxidative Stress in Chagas Disease.* 2009. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009: 190354. ISSN: 1687-7098 Epub 2009 Jun 14.

HAN MJ, KIM BY, YOON SO, CHUNG AS. Cell proliferation induced by reactive oxygen species is mediated via mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. Mol Cells. 2003 Feb 28; 15(1):94-101.

HIGUCHI ML, BENVENUTI L, MARTINS M, METZGER M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Cardiovasc. Res. 2003 Oct 15; 60(1): 96-107. ISSN: 0008-6363.

HIGUCHI ML, DE MORAIS CF, PEREIRA BARRETO AC, LOPES EA, STOLF N, BELLOTTI G, PILEGGI F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. Clin Cardiol. 1987 Nov; 10(11):665-70.

HOGG N, DARLEY-USMAR V.M, WILSON M.T. AND MONCADA S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. Biochem J. 1992 Jan 15; 281(Pt 2): 419-424

IDE T, TSUTSUI H, KINUGAWA S, UTSUMI H, KANG D, HATTORI N, UCHIDA K, ARIMURA K, EGASHIRA K, TAKESHITA A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. Circ Res. 1999 Aug 20;85(4):357-63.

JERCIC MI, MERCADO R, VILLARROEL R. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *J Clin Microbiol.* 2010 Oct; 48(10):3824-3826

KOPPENOL WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 1992 Nov-Dec; 5(6): 834-842.

KORSHUNOV SS E IMLAY JA. A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 2002 Jan; 43(1):95-106.

KOZLOVSKY N, RUDICH A, POTASHNIK R, EBINA Y, MURAKAMI T, BASHAN N. Transcriptional activation of the Glut1 gene in response to oxidative stress in L6 myotubes. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26; 272(52):33367-72.

LORCA M, GARCÍA A, BAHAMONDE MI, FRITZ A AND TASSARA R. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev. méd. Chile.* 2001 Mar; 129(3).

LUDWIG DL, MACINNES MA, TAKIGUCHI Y, PURTYMUN PE, HENRIE M, FLANNERY M ET AL. A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation embryonic progression and ionizing radiation sensitivity. *Mutat Res.* 1998 Oct 21. 409(1): 17-29.

MACHADO FS, MARTINS GA, ALIBERTI JC, MESTRINER FL, CUNHA FQ, SILVA JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000 Dec 12; 102(24):3003-8.

MARTINS-MELO F, ALENCAR C, RAMOS A, HEUKELBACH J. Epidemiology of Mortality Related to Chagas' Disease in Brazil, 1999–2007. *Plos Neglected Tropical Disease.* 2012; 6(2):e1508. Epub 2012 Feb 14.

MASSON M, NIEDERGANG C, SCHREIBER V, MULLER S, MENISSIER-DE MURCIA J. AND DE MURCIA G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 1998 Jun; 18(6): 3563-3571.

MCNEILL DR AND WILSON DM. A Dominant-Negative Form of the Major Human Abasic Endonuclease Enhances Cellular Sensitivity to Laboratory and Clinical DNA-Damaging Agents. *Mol Cancer Res.* 2007 Jan; 5(1): 61-70

MINSAL. Boletín de Vigilancia en Salud Pública de Chile. 2007

MINSAL. Circular de vigilancia de Enfermedad de Chagas (CIE 10: B57, P00.2 y Z22.8). 2011.

MINSAL. Boletín de Vigilancia en Salud Pública de Chile. 2012.

MONCAYO A, SILVEIRA AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul; 104 Suppl 1:17-30.

NAKAGAWA H, HASUMI K, WOO JT, NAGAI K, WACHI M. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis.* 2004 Sep; 25(9):1567-74. Epub 2004 Apr 16.

NEWSHOLME P, REBELATO E, ABDULKADER F, KRAUSE M, CARPINELLI A, CURI R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol.* 2012 Jul; 214(1):11-20. Epub 2012 Apr 30.

OLIVEIRA PL, KAWOoya JK, RIBEIRO JM, MEYER T, POORMAN R, ALVES EW, WALKER FA, MACHADO EA, NUSSENZVEIG RH, PADOVAN GJ, MASUDA H. A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the

blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 1995 May 5; 270(18):10897-901.

PELUFFO G, PIACENZA L, IRIGOIN F, ALVAREZ MN, RADI R. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol*. 2004 Aug; 20(8):363-369.

PÉREZ-FUENTES R, GUÉGAN JF, BARNABÉ C, LÓPEZ-COLOMBO A, SALGADO-ROSAS H, TORRES-RASGADO E, BRIONES B, ROMERO-DÍAZ M, RAMOS-JIMÉNEZ J, SÁNCHEZ-GUILLÉN MDEL C. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol*. 2003 Mar; 33(3):293-299.

PÉREZ J, GALLEGO C, BERNIER-VILLAMOR V, CAMACHO A, GONZÁLEZ-PACANOWSKA D. AND RUIZ-PÉREZ L.M. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 1999 Feb 1; 27(3): 771-777.

PIACENZA L, ALVAREZ MN, PELUFFO G, RADI R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Aug;12(4): 415-421. Epub 2009 Jul 17.

PIACENZA L, PELUFFO G, ALVAREZ MN, KELLY J, WILKINSON S, AND RADI R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochem J*. 2008 Mar; 410(2): 359-368.

PRYOR WA, SQUADRITO GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995 May; 268 (5 Pt 1): L699-722.

RADAK Z, ZHAO Z, GOTO S, KOLTAI E. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med.* 2011 Aug;32(4-6):305-15. Epub 2011 Oct 15.

RASSI A Jr, RASSI A, MARIN-NETO J. Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2010 Apr 17; 375(9723): 1388-1402.

RUDICH A, KOZLOVSKY N, POTASHNIK R AND BASHAN N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol.* 1997 May; 272(5 Pt 1):E935-40

SALDAÑA A, PINEDA V, MARTINEZ I, SANTAMARIA G, SANTAMARIA A, MIRANDA A, CALZADA J. A New Endemic Focus of Chagas Disease in the Northern Region of Veraguas Province, Western Half Panama, Central America. *Plos One.* 2012; 7(4). e34657. Epub 2012 Apr 25.

SEPULVEDA S. 2012. Manuscrito en preparación.

SCHMUNIS GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30; 102(Suppl. 1):75e85.

SHRIVASTAV M, DE HARO L.P. AND NICKOLOFF J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 2008 Jan; 18(1): 134-147

SLUPPHAUG G, KAVLI B. AND KROKAN H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 2003 Oct 29; 531(1-2): 231-251. ISSN: 0027-5107.

STEENKAMP DJ. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Feb; 4(1):105-21

TANAKA Y, TANOWITZ H, BLOOM BR. Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infect Immun.* 1983 Sep; 41(3):1322-31.

TOSO A, VIAL F, GALANTI G. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile.* 2011 Feb; 139(2): 258-266. Epub 2011 Jul 11.

TYLER K, ENGMAN D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001 May 1; 31(5-6): 472-481

ULBERT S, EIDE L, SEEBERG E, BORST P. Base J, found in nuclear DNA of *Trypanosoma brucei*, is not a target for DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst).* 2004 Feb 3; 3(2): 145-154.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interac.* 2006 Mar 10; 160(1):1-40. Epub 2006 Jan 23.

VAN LOON B, MARKKANEN E, HÜBSCHER U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst).* 2010 Jun 4; 9(6): 604-616.

VEGA S Y NÁQUIRA C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). 2006

VYATKINA G, BHATHIA V, GERSTNER A, PAPACONSTAN J, GARG N. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004 Jun 28; 1689(2): 162-173.

WALLACE DC. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J.* 2000 Feb;139(2 Pt 3):S70-85.

WIESE AG, PACIFICI RE, DAVIES KJ. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Apr 1; 318(1):231-40.

WILKINSON S, TAYLOR M, HORN D, KELLY J, CHEESEMAN I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 Apr 1; 105(13): 5022-5027. Epub 2008 Mar 26.

WISEMAN H AND HALLIWELL B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 1996 Jan 1; 313 (Pt 1): 17-29.

XANTHOUDAKIS S, SMEYNE RJ, WALLACE JD, CURRAN T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20; 93(17): 8919-8923.

YUN O, LIMA M. A, ELLMAN T, CHAMBI W, CASTILLO S, FLEVAUD L, RODDY P, PARREÑO F, ALBAJAR VIÑAS P, PALMA P.P. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médicins Sans Frontières. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Jul 7; 3(7):e488.

ZACKS M, WEN J, VYATKINA G, BHATIA V AND GARG N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc.* 2005 Dec; 77(4): 695-715. Epub 2005 Nov 29.

ZARKOV O. Base excision DNA repair, *Cell Mol Life Sci.* 2008 May; 65(10): 1544-1565.

ZHANG Q, PAN J, ZHAO CH, WANG Y, JIA Z. AND ZHENG R. Non-enzymatic fast repair of DNA oxidative damage might also exist in cells. *Cell Biol Int.* 2008 Jun; 32(6): 654-662. Epub 2008 Feb 3.

ZINGALES B, ANDRADE S, BRIONES M, CAMPBELL D, CHIARI E, FERNANDES O, GUHL F, LAGES-SILVA E, MACEDO A, MACHADO C, MILES M, ROMAHA A, STURM N, TIBAYRENC M, SCHIJMAN A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Nov; 104(7): 1051-1054.