

UCH-FC
MAG-D
R 741
C.1

METILACION DEL DNA EN Trypanosoma cruzi. SU RELACION CON
LA PROLIFERACION CELULAR.

Tesis entregada a la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética.



por

MARIA VERONICA ROJAS DURAN

Director de Tesis : Prof. Norbel Galanti Garrone.

1992

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

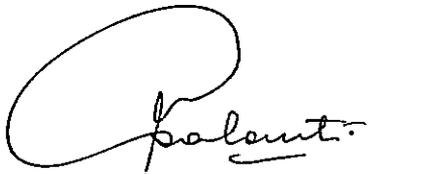
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

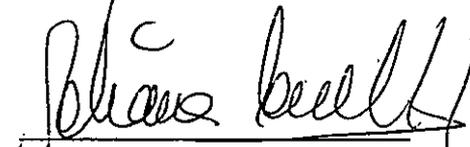
María Verónica Rojas Durán

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención Genética.

Director de Tesis
Prof. Norbel Galanti G.



Comisión Informante de Tesis
Dra. Eliana Canelo



Dra. Liliana Cardemil



Dr. Carlos Jerez



Dr. Antonio Morello



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Norbel Galanti G. y fue financiada por los siguientes proyectos : Grant 820599 de UNDP/World/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; Grant TWAS RG 54-CHL-19; Proyectos Fondecyt-Chile 209-87 y 096-89; Proyecto del Departamento de Investigación (DTI) B-2365-8723, Universidad de Chile y Beca PG 110-92, del Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.

A MIS PADRES

A RODRIGO Y NUESTRO HIJO TOMAS

A MIS HERMANOS

CON TODO MI CARIÑO Y GRATITUD

Al finalizar esta etapa de mi formación científica, quiero manifestar mi especial gratitud a :

- El profesor Norbel Galanti, por su apoyo irrestricto, su confianza en mí y su cariño, tan importantes como su sólida influencia en mi formación científica.

- Los profesores Yolanda Repetto, Jorge Aldunate y Antonio Morello, por su apoyo y su inagotable buena disposición para facilitar algunos materiales y equipos empleados en esta tesis.

- Los Dres. Carlos Frasch y Juan José Cazzulo, por la gentileza de recibirme en sus laboratorios y a sus respectivos colaboradores Roberto Macina y Alejandra Raimondi, por enseñarme algunas técnicas empleadas en esta tesis.

- La profesora Cecilia Toro, por muchas enriquecedoras conversaciones que fueron un permanente estímulo.

- Todos los académicos de la Unidad de Biología Celular y Molecular del Departamento de Biología Celular y Genética, especialmente al profesor Remigio López, por todas las veces que me ayudaron a resolver inquietudes referidas a esta tesis.

- Mis compañeros de "oficina" Mónica Morales, José Grenet y Esteban Ordenes y muy especialmente Héctor Díaz, porque con su amistad y ayuda hicieron muchas veces más llevadero el trabajo de laboratorio.

- La profesora Mónica Acuña, por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de algunos resultados de esta tesis.

- Mis compañeros de laboratorio Nicolás, Mario, Valeria y Jaime, por los buenos momentos compartidos.

- Claudio Figueroa por su constante apoyo y asistencia técnica, Héctor Muñoz por su excelente trabajo fotográfico, Natacha Salgado y Magaly Gómez por su permanente ayuda de secretaria.

- Roberto, José, Carlos y Rolando por su asistencia en el laboratorio.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS	vi
INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xix
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	23
Materiales :	
- Cepas	23
Métodos :	
1. Cultivo de células	24
2. Cosecha de células	24
3. Efecto de 5-azacitidina sobre la proliferación	25
3.a. Turbiedad y número de células	25
3.b. Incorporación de timidina-H ³	26
4. Efecto de 5-azacitidina sobre algunos parámetros metabólicos de epimastigotes	28

4.a. Incorporación de uridina- H^3 en RNA y leucina- H^3 en proteínas	28
4.b. Determinación del contenido de RNA y proteínas por célula	29
4.c. Determinación del consumo de oxígeno	31
5. Efecto de 5-azacitidina sobre la diferenciación celular	31
6. Detección de bases metiladas por cromatografía en papel	33
6.a. Incorporación de adenosina- H^3	33
6.b. Incorporación de metionina [metil- H^3]	34
6.c. Obtención de DNA nuclear	34
6.d. Purificación del DNA	35
6.e. Cuantificación del DNA	37
6.f. Hidrólisis del DNA	37
6.g. Cromatografía en papel	38
7. Detección de bases metiladas por HPLC	39
7.a. Obtención del DNA nuclear	39
7.b. Purificación del DNA	40
7.c. Hidrólisis del DNA	40
7.d. Separación de las bases por HPLC	40

8. Detección de bases metiladas	
por enzimas de restricción	41
8.a. Obtención de DNA nuclear	41
8.b. Tratamiento con enzimas	
de restricción	42
8.c. Electroforesis en geles	
de agarosa	43
8.d. Transferencia de fragmentos	
de restricción a nitrocelulosa	44
8.e. Marcación de DNA con P ³²	45
8.f. Hibridación	46
8.g. Exposición y revelado	47
RESULTADOS	48
1. Efecto de 5-azacitidina sobre la	
proliferación de epimastigotes	
en cultivo	48
2. Efecto de 5-azacitidina sobre	
algunos parámetros metabólicos	
de epimastigotes en cultivo	54
3. Efecto de 5-azacitidina sobre	
la diferenciación celular	54
4. Detección de bases metiladas	
por cromatografía de papel	59

4.a. Marcación de adenina y metiladenina por incorporación de adenosina- H^3	62
4.b. Marcación de bases metiladas por incorporación de radicales metilo radiactivos	64
4.c. Eliminación de la contaminación del DNA por RNA	66
5. Detección de bases metiladas por HPLC	67
6. Detección de bases metiladas por digestión del DNA con enzimas de restricción	71
DISCUSION	80
BIBLIOGRAFIA	99
PUBLICACIONES	118

INDICE DE TABLAS

1. Efecto de 5-azacitidina sobre la incorporación de timidina [metil- H^3] en el DNA de epimastigotes de T. cruzi. 53
2. Efecto de 5-azacitidina sobre algunos procesos metabólicos en epimastigotes de T. cruzi. 55
3. Efecto de 5-azacitidina sobre la diferenciación de T. cruzi en cultivo. 58
4. Análisis de bases del DNA_N de T. cruzi, marcado con adenosina- H^3 , por cromatografía en una y dos dimensiones. 63
5. Análisis de bases del DNA_N de T. cruzi, marcado con metionina [metil- H^3], por cromatografía bidimensional. 65

INDICE DE FIGURAS

1. Efecto de 5-azacitidina sobre la proliferación de epimastigotes de T. cruzi. 49
2. Efecto de 5-azacitidina sobre un cultivo exponencial de epimastigotes de T. cruzi. 51
3. Formas epimastigotes y transitorias de T.cruzi 57
4. Separación de bases patrones por cromatografía bidimensional. 60
5. Separación de bases patrones por HPLC. 68
6. Análisis de bases del DNA de espermio de salmón por HPLC. 69
7. Análisis de bases del DNA_N de T. cruzi por HPLC. 70

8. Análisis de bases del DNA _N de <u>T. cruzi</u> , tratado con 5-azacitidina, por HPLC.	72
9. Digestión de DNA _N de <u>T. cruzi</u> con las enzimas de restricción MspI y HpaII.	74
10. Hibridación del clon 2 a fragmentos de endonucleasas de restricción de DNA de <u>T. cruzi</u>	75
11. Hibridación del clon 7 a fragmentos de endonucleasas de restricción de DNA de <u>T. cruzi</u>	76
12. Hibridación del clon 13 a fragmentos de endonucleasas de restricción de DNA de <u>T. cruzi</u>	77
13. Hibridación del clon 30 a fragmentos de endonucleasas de restricción de DNA de <u>T. cruzi</u>	78
14. Hibridación del DNA nuclear de la cepa Tulahuén a fragmentos de endonucleasas de restricción de DNA de <u>T. cruzi</u>	79

LISTADO DE ABREVIATURAS

T. cruzi : Trypanosoma cruzi
T. brucei : Trypanosoma brucei
T. equiperdum : Trypanosoma equiperdum
A : adenina
mA : metiladenina
C : citosina
mC : metilcitosina
G : guanina
T : timina
5-azaC : 5-azacitidina
DNA : ácido desoxirribonucleico
DNAsa : desoxirribonucleasa
DNA_K : DNA del kinetoplasto
DNA_N : DNA nuclear
RNA : ácido ribonucleico
RNAsa : ribonucleasa
rRNA : RNA ribosomal
tRNA : RNA de transferencia
dCTP : desoxicitidina trifosfato
cm : centímetro

cpm : cuentas por minuto
Ci : Curie
 μ Ci : microcurie
EDTA : ácido etilendiaminotetraacético
FBS : suero fetal de bovino
HPLC : cromatografía líquida de alta presión
h : hora
g : gramo
mg : miligramo
ng : nanogramo
pg : picogramo
 μ g : microgramo
ml : mililitro
 μ l : microlitro
nm : nanometro
 μ m : micrometro
min : minuto
M : molar
mM : milimolar
 μ M : micromolar
mmol : milimol
pb : pares de bases
Kpb : kilopares de bases
PPO : 2,5-difeniloxazol

POPOP : (1,4-bis [2-(5-fenil-2-oxazolil)]
 benceno, p-fenileno-bis [5-feniloxazol])

PBS : buffer fosfato salino

PCA : ácido perclórico

P/V : peso/volumen

V/V : volumen/volumen

SAM : S-adenosilmetionina

SDS : dodecil sulfato de sodio

TCA : ácido tricloroacético

TRIS : tris [(hidroximetil) aminometano]

U : unidad

UV : ultravioleta

V : volt

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el protozoo que produce la enfermedad de Chagas, endémica en Latinoamérica y con una incidencia importante en varias regiones de nuestro país. Este parásito presenta 3 formas celulares durante su ciclo de vida (amastigote, epimastigote y tripomastigote) con diferentes características morfológicas, replicativas e infectivas las que deben estar reguladas a nivel génico. Nuestro objetivo es estudiar la presencia en T. cruzi de un mecanismo bastante universal de regulación de la expresión génica, como es la metilación del DNA. Además, nos interesa establecer una posible participación de esta modificación del DNA en la regulación de la proliferación celular del parásito.

En el DNA nuclear de eucariontes superiores sólo se encuentra como base modificada la 5-metilcitosina; en cambio, en el de eucariontes unicelulares están presentes 5mC o 6-metiladenina o ambas bases. En general, las regiones no expresadas activamente del DNA están metiladas en citosina; mientras que aquellas que se transcriben activamente y que

son más sensibles a DNAsas, están hipometiladas o no metiladas en esta base. Por el contrario, las secuencias metiladas en adenina corresponden a genes que se expresan y son sensibles a DNAsas.

Para estudiar la metilación del DNA como un posible mecanismo de regulación de la expresión génica durante la proliferación celular en T. cruzi, este parásito fué tratado con 5-azacitidina, un análogo de citosina que induce hipometilación del DNA. El tratamiento de epimastigotes de T. cruzi con esta droga mantiene a las células en activa proliferación, mientras que las células controles, epimastigotes no tratados, alcanzan la fase estacionaria. Este efecto es observado por un aumento tanto en el número de células como en la incorporación de timidina- H^3 en el DNA de epimastigotes de T. cruzi tratados con la droga, en relación a los controles. El tratamiento con 5-azaC no modifica la cantidad de RNA y proteínas totales por célula, y aumenta el consumo de oxígeno por célula, resultado esperable y compatible con la estimulación de la proliferación inducida por esta droga. Finalmente, 5-azaC no induce diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes en cultivo.

La presencia de bases metiladas en el DNA nuclear de formas epimastigotes de T. cruzi fué analizada por

cromatografía sobre papel y por HPLC. El análisis por HPLC de los hidrolizados de DNA muestra, además de las bases normales, un pico de absorbancia correspondiente a 5mC y otro que probablemente corresponde a 6mA, los que desaparecen cuando los parásitos son tratados con 5-azaC. Por otra parte, el DNA extraído de epimastigotes incubados con metionina [metil- H^3] y analizado por cromatografía sobre papel presenta 5mC.

Por medio del análisis del DNA de T. cruzi con las enzimas de restricción MspI y HpaII no se detecta metilación en la secuencia -CCGG- ; esto sugiere que, probablemente, la 5mC está localizada en otra secuencia de bases.

Nuestros resultados muestran que el DNA nuclear de T. cruzi está metilado en citosina y muy probablemente en adenina, y que esta modificación química del material genético participa en la regulación de la proliferación celular de la forma epimastigote de este parásito.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the agent that produces Chagas disease, which is endemic in Latinoamerica and of considerable incidence in some regions of Chile.

T. cruzi presents three cellular forms during its life cycle : amastigote, epimastigote and trypomastigote. The morphological, replicative and infective characteristics of these forms should be regulated at the genetic level. Our objective is to study whether a general mechanism of regulation of gene expression, that is DNA methylation, operates in T. cruzi and the way that cell proliferation is controlled by this modification.

DNA from higher eukaryotes is modified only in the form of 5-methylcytosine. Nevertheless, in unicellular eukaryotes 5mC or 6-methyladenine or both are found. Inactive DNA regions are usually methylated in cytosine. On the other hand, regions with active transcription and which are more sensitive to DNAase, are hypomethylated or non-methylated in cytosine. On the contrary, sequences containing methylated

adenine correspond to active and DNAase sensitive sequences.

To study DNA methylation as a possible mechanism of control of cell proliferation in T. cruzi, this parasite was treated with 5-azacytidine, -an analog of cytosine which induces DNA hypomethylation. Treatment of T. cruzi epimastigotes with this drug maintains cells in proliferation when control, non-treated epimastigotes enter the stationary phase. This effect was observed by an increase in the number of cells and by induction of ³H-thymidine incorporation into DNA in T. cruzi epimastigotes. This treatment did not disturb several metabolic parameters measured and did not induce cell differentiation from epimastigote to trypomastigote in culture.

The presence of methylated bases in epimastigote nuclear DNA was analyzed by paper chromatography and HPLC. Analysis of nucleotidic bases from hydrolyzed T. cruzi DNA by HPLC showed, in addition to normal bases, one peak which corresponded to 5mC and another which probably corresponded to 6mA. These peaks were absent when cultures were treated with 5-azaC. On the other hand, DNA extracted from epimastigotes labelled with [³H-methyl] methionine and analysed by paper chromatography presented 5mC.

The sequence -CCGG- was not found methylated by restriction analysis of T. cruzi DNA with MspI and HpaII endonucleases. Thus, 5mC probably should be located in a different sequence.

Our results show that T. cruzi DNA is methylated in cytosine and probably adenine, and that this chemical modification of the genetic material may play a role in the regulation of cell proliferation in the epimastigote form of this parasite.

INTRODUCCION.

Los tripanosomas son protozoos unicelulares parásitos de vertebrados, invertebrados y de plantas [1]. Entre ellos, Trypanosoma cruzi es patógeno del hombre y causa la tripanosomiasis americana conocida comunmente como enfermedad de Chagas [2,3].

Este mal debe su nombre a su descubridor, el médico brasilero Carlos Chagas, quién, en 1909, observó en la sangre de pacientes afectados por una infección hasta entonces desconocida, parásitos flagelados a los que llamó T. cruzi en honor a su maestro Oswaldo Cruz [2-4].

La enfermedad de Chagas es endémica en todos los países de Latinoamérica, desde el límite EEUU-México hasta el paralelo 35 al sur, donde existen aproximadamente 24 millones de personas infectadas. La mayor incidencia se encuentra en Brasil, Argentina y Venezuela [3]. En Chile, la enfermedad se extiende desde el límite norte con Perú hasta la sexta región y el número de casos se ha estimado en 700.000 [5].

Durante la fase inicial o aguda, de 4-5 semanas de duración, la enfermedad presenta signos leves (fiebre moderada, vómitos, diarrea); en esta etapa hay un elevado número de parásitos en la sangre, con una rápida propagación de éstos en tejidos y órganos del huésped. En la fase latente, que es asintomática, persiste una baja parasitemia y multiplicación intracelular de parásitos. Esta etapa puede durar 10-20 años, la vida del paciente, o progresar a la fase crónica sintomática, con la manifestación de miocarditis, o dispepsia de los órganos blancos (esófago o colon). Estos síntomas clínicos cada vez más severos e irreversibles, finalmente llevan a la muerte del paciente [3].

La principal vía de transmisión la constituyen insectos triatomíneos, hematófagos obligados de hábitos nocturnos. De ellos, existen 3 géneros de importancia en la transmisión de la enfermedad : Triatoma, Rhodnius, y Panstrongylus, cuyas especies varían de un área geográfica a otra. En Chile, los vectores del ciclo doméstico y silvestre son Triatoma infestans y Triatoma spinolai, respectivamente, los que se conocen comúnmente como vinchucas [3].

Las posibilidades de erradicar este mal parecen remotas. A la fecha, no existen drogas capaces de curar radicalmente la enfermedad. Derivados de nitrofurano son

efectivos en reducir la parasitemia y acortar el período y severidad de los síntomas clínicos. Sin embargo, estas drogas sólo son efectivas en la fase aguda de la enfermedad, pues aparentemente no atacan estados intracelulares del parásito; además, presentan efectos tóxicos colaterales [2,3]. Por otra parte, los ensayos de inmunización con antígenos del parásito, realizados en animales, no han otorgado protección contra la enfermedad, o ésta ha sido sólo parcial [6]. Contribuye a hacer más difícil aún la extinción de esta patología, la existencia de numerosos reservorios animales silvestres y domésticos del parásito (perros, gatos, conejos, ovejas, cabras, etc.), los que presentan una amplia distribución geográfica y un estrecho contacto con vectores potenciales [2].

El control de los vectores mediante insecticidas ha probado reducir los riesgos de la infección humana en las áreas endémicas. Sin embargo, la medida más efectiva a largo plazo, es la mejora de las viviendas a fin de eliminar las condiciones que favorezcan el desarrollo de estos insectos (grietas en las paredes, techos de paja, etc.) [2,3].

La falta de agentes quimioterapéuticos efectivos contra el parásito, resalta la importancia de conocer

aspectos fundamentales de la estructura y fisiología de T. cruzi, a fin de detectar posibles blancos para drogas que ataquen selectivamente al parásito y no al hospedador. Alternativamente, estudios sobre la biología celular y molecular del T. cruzi proveerán de información valiosa para una estrategia dirigida a la preparación de vacunas.

Dependiendo del medio ambiente en que se encuentra, T. cruzi presenta 3 formas celulares diferentes: amastigote, esférico u oval, de 2-4 μm de diámetro, sin flagelo evidente o con uno muy corto y libre; constituye la forma que se divide intracelularmente en "seudoquistes" localizados en los tejidos del hospedador vertebrado; epimastigote, alargado, de aproximadamente 20 μm de longitud, con un flagelo libre y el kinetoplasto localizado anterior al núcleo; es la forma que se multiplica extracelularmente en el tracto digestivo del vector y en medios de cultivo; y tripomastigote, de alrededor de 20 μm de largo, con un flagelo y una membrana ondulante que se extiende por todo el largo del parásito y el kinetoplasto ubicado posterior al núcleo; se encuentra en la sangre del mamífero infectado y en el recto del vector, no se divide y constituye la forma infectiva para el hombre [2,3,7].

Las características fenotípicas propias de cada

estado son el resultado de la expresión de genes diferentes en cada uno de ellos. De allí que resulte particularmente interesante conocer los mecanismos que regulan la expresión de estos genes.

La enfermedad de Chagas se transmite cuando el insecto vector infectado, al momento de picar para succionar la sangre que le sirve de alimento, deposita sobre la piel heces y orina contaminadas con tripomastigotes. Estas formas infectivas penetran a través de una lesión de la piel, que puede ser la propia picadura del insecto, o una mucosa erosionada. En el lugar de la picadura, los tripomastigotes son fagocitados por macrófagos, produciéndose una reacción inflamatoria característica llamada chagoma. Sin embargo, los tripomastigotes sobreviven a la fagocitosis, aparentemente por su capacidad de atravesar la membrana de la vacuola fagocítica y alojarse en el citoplasma. Allí se transforman a amastigotes, replicándose numerosas veces, antes de volver a adquirir la forma tripomastigote. Estos pasan al torrente sanguíneo desde donde invaden las diferentes células de los tejidos del huésped, preferencialmente aquellas musculares y ganglionares. Una vez dentro de la célula huésped, los tripomastigotes se transforman en amastigotes y reinician el ciclo infectivo. Por otra parte, el vector se infecta ingiriendo tripomastigotes presentes en la sangre de un

mamífero infectado. En el intestino medio de la vinchuca, estas formas se diferencian a epimastigotes los que se multiplican y luego, en la ampolla rectal del insecto, se transforman en tripomastigotes denominados metacíclicos [2,7,8].

La ubicación de T. cruzi en la escala evolutiva es la siguiente [1]:

Reino	:	Protista
Sub-reino	:	Protozoa
Phylum	:	Sarcomastigofora
Sub-phylum	:	Mastigofora
Clase	:	Zoomastigofora
Orden	:	Kinetoplastida
Sub-orden	:	Tripanosomatina
Familia	:	Tripanosomatidae
Género	:	Trypanosoma

Dentro del género Trypanosoma, T. cruzi pertenece al grupo estercoraria porque es transmitido por las deposiciones del vector. Los tripanosomas africanos, que se transmiten por la saliva del insecto, integran el grupo salivaria [3].

T. cruzi es una población genéticamente heterogénea de organismos. Corresponde a un conjunto de clones que presenta diferencias en la tasa de crecimiento intra y extracelular, la cantidad de DNA, los antígenos presentes en su superficie, etc. Esta diversidad genotípica también se manifiesta a través del análisis de poblaciones naturales del parásito por esquizodemas, basado en la separación electroforética de fragmentos de DNA mitocondrial generados por enzimas de restricción, y por zimodemas, determinado por los patrones electroforéticos de isoenzimas. Los zimodemas y esquizodemas serían clones naturales del parásito, que han retenido sus características en grandes áreas geográficas y por largos períodos de tiempo, comportándose como entidades genéticas independientes, probablemente como resultado de la ausencia de recombinación. La diversidad de clones que coexisten en la naturaleza puede ser uno de los factores que explique la gran variedad de formas en que se manifiesta la enfermedad, tanto en la fase aguda como crónica [9,10,11].

T. cruzi aparentemente no presenta transmisión sexual de material genético. La ausencia de recombinantes no se debe a la falta de oportunidades de apareamiento pues diferentes cepas isoenzimáticas pueden coexistir en un mismo huésped vertebrado o invertebrado. La falta de recombinantes se debe a que no ocurre segregación meiótica. Es así como, de

todas las combinaciones genéticas esperadas para isoenzimas, sólo se detectan unas pocas porque hay una asociación relativamente constante de los alelos en los diferentes loci [9,10,12,13].

El análisis del patrón de bandeo electroforético de diferentes isoenzimas de T. cruzi señala que la mayoría de los loci para estas enzimas son heterocigotos, por lo que se ha inferido que este organismo es diploide [9,13].

Una peculiaridad de los tripanosomas es que presentan alrededor de 20% de DNA mitocondrial localizado en el kinetoplasto [8]. Esta estructura corresponde a una extensión altamente especializada del sistema mitocondrial, una red tubular que recorre toda la célula y en la cual está inserto el kinetoplasto [7]. La localización de esta estructura permite diferenciar morfológicamente las formas epimastigote y tripomastigote pues en los primeros se ubica anterior y en los segundos posterior al núcleo [2].

El DNA del kinetoplasto (DNA_k) consiste de 2 especies de moléculas: minicírculos y maxicírculos, encadenados formando una gran red de DNA. Los maxicírculos, en número de 20 a 50 por célula, corresponden al 5% del DNA_k , su tamaño es de 20-40 kpb y codifican para algunas funciones

mitocondriales. Los minicírculos son alrededor de 5×10^3 - 10^4 por célula, su tamaño varía de 700 a 2.500 pb y no se conoce que codifiquen para algún producto [14,15].

Se han estimado distintos contenidos de DNA en T. cruzi, dependiendo de la cepa y de la técnica empleada. Se ha encontrado valores de 0.157 [16] y 0.173 [17] pg/célula mediante reacción colorimétrica específica para desoxirribosas. Por otra parte, valores de 0.28 pg de DNA_N y 0.054 pg de DNA_K han sido estimados mediante mediciones de fluorescencia in situ [18]. La capacidad codificante se ha estimado en 11.000 genes de tamaño promedio de 1.500 pb. En relación a la organización del DNA de este parásito, mediante cinética de reasociación DNA-DNA, algunos autores han determinado que presenta 9, 51 y 23% de DNA moderadamente repetido, con baja repetición y de copia única, respectivamente [18], mientras otros investigadores han establecido, mediante la misma técnica, 9, 35 y 49% de DNA altamente, medianamente repetido y de copia única respectivamente [19].

El DNA nuclear está asociado a proteínas básicas de tipo histonas y su cromatina está organizada en nucleosomas [20]. La caracterización más sistemática de estas proteínas revela que corresponden a 6 histonas, de las cuales algunas

presentan movilidades electroforéticas similares y otras diferentes a aquellas señaladas normalmente como de referencia; con variantes tanto alélicas como postraduccionales, y una histona H1 que comparte propiedades de solubilidad e inmunológicas con las de otras especies [21,22,23].

T. cruzi presenta una mitosis atípica, sin desaparición de la envoltura nuclear. En la interfase, la cromatina está organizada en aglomeraciones distribuídas en la periferia del núcleo, mientras que, durante la división, ésta permanece homogéneamente dispersa a través del núcleo, sin formar cromosomas discretos. La mitosis de este parásito también se caracteriza por la aparición de 10 placas densas localizadas en el plano ecuatorial del núcleo y la formación de un huso regular. Estas placas estarían asociadas por una parte con los microtúbulos, y por otra, con la cromatina, y actuarían como cinetocoros [24].

La cromatina de los tripanosomatídeos no se condensa durante la mitosis; por lo tanto, los cromosomas no pueden ser visualizados por microscopía óptica. Sin embargo, se pueden separar moléculas de DNA de gran tamaño (cromosomas) mediante electroforesis en gradiente de campo pulsado. Existe heterogeneidad entre diferentes cepas de T.

cruzi en cuanto al patrón de estos cromosomas y la localización de diferentes genes en ellos. Los trabajos publicados coinciden en señalar un cariotipo de al menos 20 cromosomas con un rango de tamaño de 200-300 Kb a 1600-2000 Kb [25-27]. Resultados menos concordantes se encuentran en relación a la existencia de minicromosomas en el genoma de T. cruzi. Por una parte, se ha postulado que el genoma de este parásito presenta una proporción relativamente pequeña de minicromosomas en el rango de 50 a 150 Kb [26], y por otra, se ha descartado su presencia [25,27], en contraste con lo que ocurre en T. brucei que presenta abundantes minicromosomas.

Experimentos de incorporación de precursores radiactivos de bases nitrogenadas, han demostrado que todas las formas de T. cruzi son incapaces de sintetizar el anillo de purinas "de novo" y dependen de la presencia de estas bases o nucleósidos en el medio. Por el contrario, pueden sintetizar pirimidinas "de novo". Tanto las bases púricas como las pirimidínicas son interconvertibles entre sí, de manera que basta la presencia de una de cada tipo en el medio para el desarrollo del parásito [28,29].

Nuestro interés se ha centrado en estudiar en T. cruzi un mecanismo de regulación de la expresión génica,

presente en eucariontes superiores, y que pueda participar en el control de la expresión de genes específicos en cada uno de los estados del parásito.

La regulación de la expresión génica en eucariontes es llevada a cabo por un gran número de mecanismos que operan a diferentes niveles. Uno de los más importantes es la metilación del DNA. Muchos estudios asocian la metilación de secuencias específicas dentro de un gen con la inactivación de su expresión génica [30-35].

La metilación del DNA es un mecanismo bastante universal de regulación de la expresión génica, pues está presente en casi todos los organismos en los cuales se ha buscado. El DNA de procariontes presenta las bases modificadas 5-metilcitosina (5mC) y 6-metiladenina (6mA) [30]. Aquel de eucariontes unicelulares presenta 5mC o 6mA o ambas bases metiladas [30,36,37]. El DNA de eucariontes superiores contiene 5mC en una cantidad que varía de 0.03 mol por ciento en insectos, 2 a 7-8 moles por ciento en mamíferos, y sobre 25 moles por ciento en plantas; ciertas algas verdes e insectos presentan además bajos niveles de 6mA [30]. El DNA de vertebrados presenta exclusivamente la base modificada 5mC, la que se ubica principalmente en la secuencia dinucleotídica CpG [31,32]. En el DNA de plantas,

en cambio, 5mC se ubica en las secuencias CpG o CpXpG [38].

Las bases metiladas no se distribuyen al azar en el DNA, lo cual fortalece la proposición que éstas juegan un rol en la regulación de la transcripción. Secuencias de DNA satélite y altamente repetido, que corresponden a regiones que no se transcriben, están altamente metiladas en citosina en comparación con aquellas de copia única [32,39].

Por otra parte, secuencias dinucleotídicas CpG no metiladas se agrupan en islas de 500 a 2000 pb, que cubren una extensa región del extremo 5' de un gen, incluyendo las secuencias hacia arriba de éste y los primeros exones. Estas islas CpG presentan una densidad 10 veces mayor de este dinucleótido que el resto de las secuencias de DNA, pero, a pesar de presentar un mayor número de citosinas potencialmente metilables, éstas permanecen no metiladas permitiendo la expresión de los genes asociados a ellas [40-42].

Islas CpG se asocian a los extremos 5' de todos los genes que se expresan constitutivamente y algunos genes tejido específicos. La cromatina de estas islas estaría organizada en una estructura más suelta y más sensible al ataque de nucleasas, probablemente porque una fracción de

ella está libre de nucleosomas, además de presentar una menor proporción de histona H1 e hiperacetilación de las histonas H3 y H4, características propias de la cromatina transcripcionalmente activa [42].

Se ha propuesto que cada tipo de tejido presenta un patrón de metilación que es específico. Al respecto, algunos sitios están metilados en todos los tejidos; otros, que forman parte de genes constitutivos que se expresan en todos los tejidos, no presentan sitios metilados, mientras que aquellos genes que codifican para funciones tejido específicas están generalmente hipometilados en citosina en aquellos tipos celulares en los cuales se expresan y altamente metilados cuando no se están expresando. Por ejemplo, los genes de la β globina están hipometilados en células eritroides de numerosas especies y metilados en los demás tipos de células [32,43].

A pesar que, en general existe correlación entre la hipometilación en citosina de un gen y la activación de su transcripción, se ha observado que, en algunos casos la ausencia de metilación en determinados sitios no es suficiente para que un gen se exprese o bien, que genes que están metilados en algunos tejidos igualmente se expresan [44,45]. Esto puede deberse a que la metilación pudiese ser

sólo uno de los diversos mecanismos involucrados en la regulación de ese gen, o que no se han hipometilado sitios críticos que determinan la activación del gen, por ejemplo, aquellos ubicados en la región 5' o promotora. Así cuando se metila artificialmente el sitio Eco RI, 79 pb hacia arriba del extremo 5' del gen de la timidina quinasa del virus Herpes simple, éste se inactiva, lo que no ocurre cuando se metila el sitio 1.1 Kpb hacia abajo del extremo 3' [44].

En aquellos organismos que presentan metilación de su DNA en adenina ocurre la situación contraria; esto es, las secuencias activas están altamente metiladas. En Tetrahymena por ejemplo, el DNA del macronúcleo, que es transcripcionalmente activo, está metilado en adenina; en cambio, el DNA del micronúcleo, que es inactivo, no lo está [36,37].

Se han postulado 2 mecanismos para explicar cómo interfiere la metilación del dinucleótido CpG con la transcripción. El primero de ellos sostiene que los factores de transcripción serían incapaces de unirse a sitios CpG metilados, y el segundo señala que CpG metilados podrían interaccionar con ciertas proteínas nucleares formando un estructura nucleoproteica que impide el acceso de factores de transcripción [46,47]. En relación a la primera alternativa,

se sabe que la metilación de un dinucleótido CpG en el centro del sitio de reconocimiento del factor de transcripción MLTF, reduce sustancialmente su unión a esta secuencia [48]. Por el contrario, no hay diferencias en la afinidad del factor de transcripción Sp1 por su sitio específico de unión cuando éste está metilado o no metilado en CpG [48]. Con respecto al segundo mecanismo propuesto, se ha detectado una proteína llamada MeCP1 que se une a una amplia variedad de secuencias de DNA metiladas en múltiples CpG. Esta proteína podría interferir con la unión de factores de transcripción o podría inducir una conformación del DNA inaccesible para los primeros [46,47]. Por otra parte, se ha observado que genes que se expresan activamente presentan una conformación más expuesta y mayor sensibilidad a DNAsas [43,49]. Además, 5mC favorece la conversión de DNA_B a DNA_Z, alterando la estructura terciaria del DNA y restringiendo la capacidad de esa región de organizarse en nucleosomas [30].

La metilación es llevada a cabo en forma postreplicativa por enzimas DNA metiltransferasas que dirigen la transferencia de grupos metilo desde S-adenosilmetionina (SAM) a posiciones específicas en ciertas bases del DNA. Estas metilasas llamadas de mantención, reconocen como sustrato específico al DNA hemimetilado, determinando la herencia semiconservativa del patrón de metilación [30-

32,43,50,51]. Existen controversias en cuanto a su modo de acción; una posibilidad es que se unan a un sitio, lo metilen y se disocien del DNA; la otra es que se unan al DNA y se desplacen a lo largo de la molécula metilando los sitios disponibles [51].

También se ha descrito metilación "de novo" en procariontes y eucariontes. Esta ha sido detectada, por ejemplo, en ciertos virus que al integrarse en el genoma de la célula huésped metilan su DNA, modificación que no estaba presente en el genoma del virus no integrado [30,31,51]. Por otra parte, se ha postulado que ocurre metilación "de novo" durante el desarrollo; ésto permitiría el establecimiento del patrón final de metilación característico del embrión y los subsecuentes tipos de células somáticas diferenciadas [52].

Sólo existe una evidencia experimental de actividad DNA demetilante en células eucariontes, que fue detectada en extractos proteicos obtenidos de núcleos de células de eritroleucemia murina [53]. Dado que no se han identificado enzimas demetilantes, se sugiere que la demetilación ocurre por un proceso pasivo mediante el cual el DNA se replica sin la concomitante metilación de mantención, probablemente por una deficiencia de SAM o el bloqueo de las metilasas de mantención por otras proteínas con la consiguiente

replicación en ausencia de éstas [31,52].

Algunos autores han planteado que los patrones de metilación observados en los tejidos mamíferos adultos, son establecidos por demetilaciones específicas en las islas CpG, en un evento programado durante el desarrollo fetal de mamíferos [54]. Otros investigadores en cambio, han sugerido que lo que ocurre es una demetilación general, seguido por un proceso de metilación "de novo" que proporciona los patrones finales de metilación tejido específicos [52].

Los niveles y patrones de metilación del DNA están alterados en células cancerosas [55-58]. Un menor nivel de metilación general del DNA se ha observado en un número de tumores y líneas celulares tumorales [55,56,58]; a pesar de ésto, algunos sitios en genes específicos, que no se expresan en estas células transformadas, estarían más metilados que su contraparte normal [56]. Por otra parte, también se ha encontrado hipometilación en tejidos en regeneración, en una proporción mayor que la esperada por efectos de replicación del DNA sóloamente, por lo que se ha asociado un alto nivel de síntesis de DNA con un decrecimiento en el contenido de 5mC [55].

También se ha observado una demetilación masiva de

sitios CpG, en células inducidas a diferenciar "in vitro" con diferentes agentes químicos [59], situación similar a la observada en células transformadas y ciertas células tumorales. Por otra parte, el compuesto 5-azacitidina, que inhibe la metilación del DNA, induce varios fenotipos diferenciados a partir de diferentes líneas celulares [57,60].

La detección de bases metiladas en el DNA de tripanosomatídeos es un problema que aún no se ha resuelto. En 1969, se reporta la ausencia de las bases modificadas metilcitosina e hidroximetilcitosina en los DNA de varios tripanosomas, incluido T. cruzi, hidrolizados en ácido perclórico y analizados por cromatografía de capa fina [19]. Posteriormente se han publicado varios trabajos realizados en tripanosomas africanos, los que han arrojado resultados contradictorios. En 1983 se reporta que existe un 1.3% de nucleósidos modificados en el DNA de T. equiperdum, ubicados principalmente en la fracción de DNA telomérico y aparentemente en reemplazo de citosina, pero no se determina su naturaleza [61]. En 1984, se señala que ocurre digestión parcial de los genes VSG teloméricos activos de T. brucei, con las enzimas de restricción PstI y PvuII, lo que sugiere una modificación del dinucleótido GC, resultado que no se observa cuando se digiere con MspI y HpaII [62,63]. Por

último, en 1988, se señala que no hay nucleótidos metilados en DNA de T. brucei y T. equiperdum, hidrolizados enzimáticamente y fraccionados por HPLC, indicando que el resultado obtenido en 1983 corresponde a un artefacto que no es 5mC ni otro nucleósido conocido [64].

En relación al DNA_k, se ha postulado la ausencia de bases metiladas en el DNA del kinetoplasto de T. cruzi, pues, la digestión con las enzimas MspI-HpaII y MboI-Sau3A no permite detectar metilación en citosina y adenina en las secuencias CCGG y GATC, respectivamente [65].

En esta tesis se ha estudiado la posible relación entre la metilación del DNA y la proliferación de T. cruzi en la forma epimastigote, y en forma preliminar, con la diferenciación de esta forma a tripomastigotes.

Una estrategia ampliamente usada para estudiar la relación entre el grado de metilación del DNA y la regulación de la expresión génica, ha sido la inducción de la hipometilación del DNA a través del agente hipometilante 5-azaC. Este compuesto es un análogo de citosina que se incorpora en el DNA que está replicando; presenta un átomo de nitrógeno en vez del carbono 5 del anillo por lo tanto no acepta un grupo metilo en esa posición [60]. Su efecto más

drástico sobre la metilación, sin embargo, se debe a que inactiva a las enzimas DNA metiltransferasas con las cuales forma un complejo covalente e irreversible [66-68].

En algunos casos, existen evidencias que 5-azacitidina induce la expresión selectiva de ciertos genes inactivos más que un aumento global en la transcripción [69]. Así, por ejemplo, la inyección de 5-azaC en células de ratón que llevan el provirus de leucemia murina, altamente metilado e inactivo, induce la transcripción del genoma viral en diferentes tejidos [70].

En este trabajo se estudió la presencia de bases metiladas en el DNA de T. cruzi y su posible participación en la regulación de la proliferación celular e incipientemente de la diferenciación de este parásito en cultivo.

HIPOTESIS

Trypanosoma cruzi presenta bases metiladas en su DNA. Esta modificación química del DNA es uno de los mecanismos de regulación que participan en el control de la proliferación del parásito en cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo general :

Estudiar la metilación del DNA en la forma epimastigote de Trypanosoma cruzi y su participación en la proliferación del parásito.

Objetivos específicos :

- Identificar bases metiladas en el DNA de epimastigotes de T. cruzi.
- Inducir la hipometilación del DNA en epimastigotes de T. cruzi.
- Relacionar la hipometilación del DNA con la proliferación de epimastigotes de T. cruzi en cultivo.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES :

Cepas :

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron con epimastigotes de T. cruzi, cepa Tulahuén de Chile, cultivados en nuestro laboratorio.

Para la determinación de bases metiladas por enzimas de restricción, se emplearon además las cepas argentinas RA en las formas epimastigote y tripomastigote y Tul 0 en la forma epimastigote, las que fueron donadas por el Dr. Carlos Frasch del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

METODOS

1.- Cultivo de T. cruzi :

Epimastigotes de T. cruzi, cepa Tulahuén chilena, se cultivaron a 28°C en medio Diamond (12.5 g triptosa, triptona, extracto de levadura y NaCl, 8.125 g K₂HPO₄ y KH₂PO₄, en 1 l agua destilada, pH 7.2) [71], al cual se agregó 2.5% de FBS inactivado, 7.5 µM de hemina, (de Sigma Chemical Co.), 1 mg/ml de estreptomicina sulfato y 100 U/ml de penicilina sódica, (de Gibco Laboratories).

2.- Cosecha de T. cruzi :

Para la extracción de DNA, los parásitos se cosecharon por centrifugación a 2500 x g, por 10 min., a 4°C, en centrífuga International IEC (modelo B-20), rotor N° 872. Una vez sedimentados se lavaron con PBS a pH 7.2 (NaCl 0.107 M, KH₂PO₄ 0.052 M) y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores.

Para experimentos en los cuales se requirió de parásitos vivos (incorporación de precursores radiactivos, determinación del consumo de oxígeno o tratamientos con

5-azaC), los epimastigotes se cosecharon en centrífuga Kubota KR600 a 650 x g, por 20 min., se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio Diamond fresco o en PBS, según el tipo de experimento.

3.- Efecto de 5-azacitidina sobre la proliferación :

3.a. Turbiedad y número de células :

Se midió el efecto de 5-azaC (de Sigma Chemical Co.), en las concentraciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M, sobre el crecimiento diario de cultivos de epimastigotes de T. cruzi. Los parásitos se cultivaron en un volumen final de 10 ml de medio Diamond, en matraces Erlenmeyer con un tubo lateral adaptado para nefelómetro. Dado que existe una relación lineal entre el número de epimastigotes y la turbiedad del medio de cultivo, la variación en el número de células se siguió diariamente por turbidimetría en un nefelómetro HF modelo DRT-100D y en algunos puntos de la curva de crecimiento por conteo directo en una cámara de Neubauer.

La solución de 5-azaC se preparó en el momento de usar y se esterilizó por filtración. En un primer tipo de experimentos, ésta se agregó a cultivos en crecimiento normal

en las concentraciones finales de 10^{-5} M a 10^{-7} M cada 24 hrs, durante 14 días. Como control se utilizó cultivos de epimastigotes sin exposición a 5-azaC.

En otros experimentos, el análogo se agregó durante 7 días, cada 24 hrs, a cultivos mantenidos continuamente en fase exponencial de crecimiento. Esta condición se obtuvo diluyendo diariamente, con medio Diamond fresco suplementado con las concentraciones correspondientes de suero, hemina y antibiótico, hasta los valores de turbiedad y número de células de un cultivo en la mitad de la fase exponencial de crecimiento; estos valores corresponden a aquellos con los cuales se inició el experimento. Cultivos mantenidos continuamente en fase exponencial de crecimiento pero sin tratamiento con 5-azaC se usaron como control.

3.b. Incorporación de timidina [metil- H^3] :

Cultivos de epimastigotes de T.cruzi tratados diariamente, durante 14 días, con 5-azaC 10^{-6} M, y controles (no tratados), se incubaron con timidina [metil- H^3] en las fases exponencial, de inflexión y estacionaria de la curva de crecimiento.

Fracciones de los cultivos de cada uno de las fases

señaladas se centrifugaron en paralelo, para obtener de cada una de ellas los parásitos y los sobrenadantes a usar como medios condicionados. Las incorporaciones se realizaron en triplicado, por 24 hrs, en alícuotas de 1.5 millones de células, en 1 ml de medio condicionado, con 10 μ Ci de timidina [metil- H^3] (67 Ci/mmol de ICN Biochemicals) y se detuvieron colocando los tubos en hielo-agua. Se centrifugó a 15600 x g por 10 min en centrífuga Eppendorf 5414. Luego, las células se lavaron con PBS a pH 7.2.

Los parásitos se rompieron por congelamiento a -70°C y descongelamiento. Se trataron con TCA al 5% por 15 min, en hielo-agua. Los precipitados se lavaron 2 veces con TCA al 5% frío, una vez con etanol al 80% frío y una vez con etanol-eter (3:1 v/v). En cada paso se centrifugó a 15600 x g por 10 min en centrífuga Eppendorf.

Los sedimentos se disolvieron en NaOH 1M y se agregó 50 μ l de esta suspensión a 5 ml de cóctel de centelleo (330 ml tritón X-100, 660 ml xileno, 5 g PPO, 0.5 g POPOP). La radiactividad se midió en un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman modelo LS 100C.

4. Efecto de 5-azacitidina sobre algunos parámetros metabólicos de epimastigotes :

4.a. Incorporación de uridina- H^3 en RNA y leucina- H^3 en proteínas :

Se cuantificó la incorporación de uridina- H^3 y de leucina- H^3 , en el RNA y proteínas totales, respectivamente, de epimastigotes cultivados por 14 días, en presencia de $10^{-6}M$ 5-azaC y controles.

Los parásitos tratados y controles se cosecharon por centrifugación, se lavaron con PBS a pH 7.2 y se resuspendieron en la misma solución. Alícuotas de 1.5 millones de células, en 1 ml de PBS, se incubaron con 50 μCi de uridina- H^3 (25.4 Ci/mmol de New England Nuclear) o con 10 μCi de L-leucina [4,5- H^3] (60Ci/mmol de ICN Biochemicals), por 3 h a 28°C.

Los parásitos se procesaron para determinar la incorporación de los precursores radiactivos, de acuerdo a lo descrito en el punto 3.b. Los sedimentos se solubilizaron en NaOH 1 N. Se agregaron 50 μl de cada suspensión a 5 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad.

4.b. Determinación del contenido de RNA y de proteínas por célula :

Se cuantificó el contenido total de RNA y de proteínas de epimastigotes de T.cruzi en cultivos tratados diariamente, durante 14 días, con 5-azaC 10^{-6} M y de células controles no tratadas.

El procesamiento de las muestras para la determinación del RNA y proteínas se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Schneider [72]. Las células se cosecharon por centrifugación y se trataron secuencialmente con TCA al 5% frío y solventes lipídicos (etanol al 80% y etanol:eter, 3:1 v/v), como se describió en el punto 3.b. Los ácidos nucleicos se extrajeron de los sedimentos con TCA al 5% a 90°C por 20 min. Se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 1750 x g por 15 min en centrífuga Kubota, a temperatura ambiente. En los sobrenadantes se midió el contenido de RNA mediante la técnica del orcinol [73] y en los sedimentos se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry y col. [74].

Para la determinación del contenido de RNA, diferentes diluciones de las muestras tratadas y controles, se llevaron a un volumen final de 1.5 ml con TCA al 5%. Se

les agregó 0.5 ml de n-butanol, 3 ml de reactivo de orcinol* y se mezclaron en vortex. Se calentaron en baño a 90°C, por 1 h, tapando los tubos con bolitas de vidrio. Se detuvo la reacción enfriando en hielo y se determinó el cromógeno formado a 660 nm en espectrofotómetro UV-190 Shimadzu. Se utilizó como estándar tRNA de levadura (de Sigma Chemical Co.) en una curva de calibración de 20 a 100 µg de RNA.

Para la determinación del contenido de proteínas, diferentes diluciones de las muestras tratadas y controles se llevaron a un volumen final de 250 µl de NaOH 1 M. Se agregó 1.25 ml de cuprotartrato de cobre*** y se mantuvo 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 125 µl de reactivo de Folin (de Sigma Chemical Co.) 1:1 v/v en agua desionizada. Se

* Reactivo de orcinol: 2 ml de una solución 50% p/v de orcinol (de Sigma Chemical Co.) en etanol absoluto, se llevaron a un volumen final de 100 ml con reactivo de ión cúprico**.

** Reactivo de ión cúprico: 0.15 g de CuCl₂ en 100 ml de HCl concentrado.

*** Cuprotartrato de cobre: se mezcló 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 1% con 1 ml de sulfato de cobre al 1%, luego, se agregaron gota a gota, agitando constantemente, 100 ml de carbonato de sodio al 2%.

mezclaron en vortex, se esperó que desarrollara color por 20 min y se midió la absorbancia a 550 nm en el espectrofotómetro. Se utilizó como estándar una curva de calibración de 25 a 75 μ g de albúmina de suero de bovino BSA (de Sigma Chemical Co.)

4.c. Determinación del consumo de oxígeno :

Se determinó el consumo de oxígeno en epimastigotes de T. cruzi provenientes de cultivos tratados diariamente, durante 14 días, con 5-azaC 10^{-6} M y de células controles no tratadas, según el método de Lessler y Brierley [75]. Las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en buffer TRIS 100 mM- NaCl 52 mM. Se contó el número de células y una cantidad conocida de parásitos, siempre superior a 160 millones de células (equivalente a 2 mg de proteínas), se llevaron a un volumen final de 2 ml de buffer.

Se midió el consumo de oxígeno en un oxígrafo Gilson 5/6 calibrado al 100% con un electrodo tipo Clark N° 2149 (Yellow Spring Instruments Co.).

5.- Efecto de 5-azacitidina sobre la diferenciación celular

Para determinar el efecto del tratamiento con el

análogo sobre la diferenciación de formas epimastigotes a tripomastigotes en cultivo, se realizaron extendidos de cultivos de T. cruzi tratados diariamente, durante 14 días, con 5-azaC 10^{-5} a 10^{-7} M y de cultivos controles. En estos extendidos se evaluaron también posibles alteraciones morfológicas inducidas por el tratamiento con 5-azaC sobre los epimastigotes.

En distintos días de la curva de crecimiento, se colocaron gotas de cultivos tratados o controles sobre un portaobjetos y se extendieron a lo largo de éste con ayuda de un cubreobjetos. Se secaron al aire y se fijaron en metanol al 100% por 7 min. Se lavaron 2 veces, por 5 min, con etanol al 70% y luego una vez con agua destilada. Se tiñeron durante 20 min. con una solución de Giemsa al 4% (2 ml de Giemsa, 1 ml de PBS a pH 6.8, 47 ml de agua destilada), se lavaron con agua destilada y se secaron al aire.

Se contaron 500 células por extendido, y 3 placas de cultivos controles y tratados con cada una de las 3 concentraciones de 5-azaC. Se consideraron epimastigotes aquellos parásitos de mayor grosor y con el kinetoplasto localizado anterior al núcleo, y tripomastigotes, aquellos parásitos delgados y con el kinetoplasto localizado posterior al núcleo. Se definieron como formas celulares transitorias o

intermedias, aquellas gruesas con el kinetoplasto ubicado entre las partes anterior y posterior del parásito.

6.- Detección de bases metiladas por cromatografía en papel :

6.a. Incorporación de adenosina- H^3 :

Se utilizó para detectar 6mA en el DNA de T. cruzi. Cultivos de epimastigotes de 3 días, se centrifugaron a 650 x g, por 20 min, a 28°C, en centrífuga Kubota. Las células se lavaron en PBS a pH 7.2 y se resuspendieron en medio Diamond suplementado con 2.5% de suero. A 1.5 millones de células por ml se agregaron 30 μ Ci de 2-adenosina- H^3 (22.3 Ci/mmol de Amersham), en dos etapas: la primera en el tiempo 0 y la segunda a las 24 hrs de cultivo. Las células se mantuvieron a 28°C. A las 48 hrs de iniciado el experimento (día 5) se detuvo la incorporación por enfriamiento en hielo-agua y centrifugación a 15600 x g por 10 min en centrífuga Eppendorf.

Simultáneamente con los cultivos radiactivos, se cosecharon epimastigotes del mismo cultivo original pero sin adenosina- H^3 para ser utilizados como acarreador. Ambos sedimentos se mezclaron y a partir de ellos se extrajo el DNA.

6.b. Incorporación de metionina [metil-H³] :

Se utilizó para detectar la presencia de bases metiladas en el DNA de T. cruzi. Los epimastigotes se incubaron con 20 μ Ci de L-metionina [metil-H³] (80 Ci/mmol de Amersham) durante toda la fase exponencial de crecimiento. En la zona de inflexión de la curva de crecimiento (día 9), se agregaron 10 μ Ci adicionales del precursor. La incubación se mantuvo hasta alcanzar la fase estacionaria, en la que se cosecharon los epimastigotes.

La manipulación de los cultivos, la concentración de células, la determinación de la incorporación y el procesamiento para la posterior extracción e hidrólisis del DNA, se realizaron como se indica en el punto 6.a..

6.c. Obtención de DNA nuclear :

Se realizó de acuerdo a Van der Ploeg y col. [76], con modificaciones menores introducidas en el laboratorio del Dr. A.C.C. Frasch, Buenos Aires, Argentina. El sedimento de células se resuspendió en una solución 10 mM TRIS, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl a pH 7.5. Se agregó SDS a una concentración final de 1% y se incubó con proteinasa K (de Sigma Chemical Co.) 50 μ g/ml, por 2 h a 37°C.

La suspensión se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo hasta la desaparición de la interfase y luego con un volumen de cloroformo. El fenol se destiló previamente, se saturó en la solución de resuspensión y se mezcló con 0.1% de 8-hidroxiquinolina. En cada paso se agitó por inversión del tubo y se centrifugó a 1000 x g, por 5 min, a 4°C, en centrífuga International, rotor N° 870.

La fase acuosa se centrifugó a 20000 x g, por 1 h, a 4°C, para descartar en el sedimento el DNA del kinetoplasto [77]. Al sobrenadante se agregó una concentración final de 0.5% SDS y se incubó con 50µg/ml de RNasa, por 2 h, a 37°C; luego, se agregaron 30 µg/ml de proteinasa K y se incubó por 1 h a la misma temperatura.

Se reextrajo con fenol-cloroformo y cloroformo. Se precipitó el DNA con acetato de sodio 0.3 M a pH 5.2 y 0.6 volúmenes de 2-propanol, durante toda la noche a -20°C. Se colectó el DNA por centrifugación a 12000 x g por 30 min a 4°C. Se lavó con etanol al 70% frío y se secó al vacío.

6.d Purificación del DNA :

Se estandarizaron las condiciones de separación del DNA de ribonucleótidos o ribonucleósidos libres, en una

columna de Sephadex G-50 (de Sigma Chemical C.O.) de 1.5 por 10 cms. La preparación de esta columna se realizó de acuerdo a Maniatis y col. [78].

Previamente se establecieron las condiciones de separación para una muestra de prueba, constituida por DNA de timo de ternera (de Sigma Chemical Co.) a la que se agregó 150.000 cuentas de uridina- H^3 . Esta mezcla se pasó por la columna a un flujo de 0.5 ml por minuto. Se colectaron fracciones de 0.5 ml y se leyó para cada una de ellas la absorbancia a 260 nm y la radiactividad.

El primer pico de absorbancia, correspondiente al DNA, se obtuvo en las fracciones 12 a 17. En ellas no se detectó radiactividad. Un segundo pico menor de absorbancia se observó en las fracciones 33 a 47, el que coincide con el pico de radiactividad correspondiente a uridina- H^3 .

Para purificar el DNA de T. cruzi, el sedimento se resuspendió en buffer TE a pH 8.0, se cargó la columna y se eluyó en las mismas condiciones de la muestra de prueba. Se colectaron las fracciones correspondientes al primer pico de absorbancia, se mezclaron y se precipitaron con acetato de sodio - 2-propanol toda la noche a $-20^{\circ}C$.

6.e. Cuantificación del DNA :

La cantidad de DNA se estableció considerando que una unidad de absorbancia es equivalente a 50 μg de DNA de doble hebra [79]. Para ello, el DNA se resuspendió en buffer TE a pH 8.0 (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se leyó su absorbancia a 260 nm. Luego, se reprecipitó con 0.3 M de acetato de sodio pH 5.2 y 0.6 volúmenes de 2-propanol durante toda la noche a -20°C .

6.f. Hidrólisis del DNA :

El DNA se sometió a hidrólisis total durante 30 min. a 175°C con ácido fórmico 98%, que libera primero las bases púricas y luego las pirimídicas [80].

El DNA precipitado se resuspendió en ácido fórmico en la relación 1 mg/0.3 ml. La suspensión se colocó en ampollas de vidrio Pyrex, las que una vez selladas a la llama del mechero, se colocaron en una estufa a 175°C por 30 min. Posteriormente el hidrolizado se enfrió a temperatura ambiente y luego a 4°C . Las ampollas se abrieron y se evaporó el solvente con nitrógeno líquido o al calor suave de la llama del mechero. El hidrolizado se resuspendió en HCl 1 N (1mg/100 μl) y se cargó toda la muestra en los cromatogramas.

6.g. Cromatografía en papel :

Los hidrolizados de DNA de T. cruzi se analizaron por cromatografía descendente en papel, en una o en dos dimensiones, de acuerdo al protocolo de Hattman [81], modificado.

Se estudió la ubicación de cada base nucleotídica (A, C, G, T), de 5mC y de 6mA (todos los estándares de Sigma Chemical Co.), en cromatogramas unidimensionales con dos sistemas de solventes : 1-butanol 86% - NH₃ 1%, o 2-propanol 65% - HCl 18%. Se observó la migración de cada una de las bases en un transiluminador UV de onda corta (UVP, ICN). Se calcularon los R_f dividiendo la distancia desde el punto en que se aplica la base hasta el centro de la mancha correspondiente, por la distancia de migración del solvente.

También se estudió la localización de las 6 bases patrones en cromatogramas bidimensionales. Para ello, se cromatografió cada una de las bases por separado y luego en una mezcla. Se utilizó 1-butanol 86%-NH₃ 1% para la primera dimensión y 2-propanol 65%-HCl 18% para la segunda. Entre ambas fases el papel se secó y se giró en 90°. Las cromatografías se realizaron durante toda la noche, dentro de

una cámara saturada con el mismo solvente utilizado para la migración.

El hidrolizado se cargó gota a gota, equidistante 5 cms de cada borde en el extremo superior derecho de un papel Whatman N°1 de 30 x 30 cms. En el mismo punto se aplicaron 10 μ g de cada una de las 6 bases patrones, para usar como referencia de la migración de las bases y su posterior ubicación en el transiluminador UV. Después de terminada la cromatografía y secado el papel, se marcó el contorno de cada base, se recortaron y se eluyeron durante 24 h en frasquitos de centelleo con 1 ml de solución 0.2 M NaCl-0.1 M HCl [82]. Se agregaron 10 ml de coctel de centelleo y se midió la radiactividad. Simultáneamente, como control se midió la radiactividad de áreas iguales en otras partes del cromatograma, la que se restó de la radiactividad presentada por las bases.

7.- Detección de bases metiladas por HPLC :

7.a. Obtención del DNA nuclear :

Se extrajo DNA de epimastigotes cultivados por 14 días y de parásitos tratados diariamente por ese tiempo con

5-azaC 10^{-6} M, según el punto 6.c. En este DNA se investigó presencia de 5mC y/o 6mA, así como el efecto de 5-azaC sobre el grado de metilación.

7.b. Purificación del DNA :

La purificación del DNA se realizó según el punto 6.d.

7.c. Hidrólisis del DNA :

Se realizó según el punto 6.f. Los hidrolizados se resuspendieron en 30 μ l de formiato de amonio 20 mM en 12% de metanol a pH 4.0.

7.d. Separación de las bases por HPLC :

Los hidrolizados de DNA de T. cruzi tratados con 5-azaC y controles, se analizaron por HPLC, tomando como base la técnica descrita por Farrance e Ivarie [83]. Se estandarizaron las condiciones de separación con 630 ng (21 ng/ μ l) de cada una de las bases patrones (A, T, C, G, 5mC y 6mA) por separado y luego de una mezcla de estas bases. Se usó como control positivo hidrolizados de DNA de espermios de salmón (de Sigma Chemical Co.).

La separación se realizó en un gradiente de 0 a 100% de solución A a B, en 20 min, a un flujo de 1 ml por min (soluciones A y B: 20 y 40 mM de formiato de amonio en metanol al 12% a pH 4.0, respectivamente). Se utilizó un equipo de HPLC Waters Associates con 2 bombas modelo 6000 A, con programa de solvente modelo 660 e inyector modelo U6K, con una columna Partisil 10 SCX Wathman de 250 x 4.6 mm, donada por el Dr. David Arnot, del Department of Molecular Biology, New York University Medical Center, New York, USA.

Se midió la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro Uvidec-100-IV Jasco. Se registró en una impresora RC-150 Jasco, con una velocidad de corrida del papel de 5 mm por min.

8.- Detección de bases metiladas por enzimas de restricción

8.a. Obtención de DNA nuclear :

Se extrajo el DNA de epimastigotes de las cepas Tulahuén chilena, Tul 0 y RA argentinas y de tripomastigotes de la cepa RA, según lo descrito en el punto 6.c. Se controló cada DNA por electroforesis en geles de agarosa al 1%, previo a la digestión con enzimas de restricción (como se detalla

en el punto 8.c.). Esto permitió determinar que el tratamiento con RNasa elimina totalmente la banda que corresponde a RNA (no mostrado).

8.b. Tratamiento con enzimas de restricción :

En eucariontes superiores, el 90% de los residuos 5mC lleva al lado 3' una guanina, formando el dinucleótido CpG, que forma parte de la secuencia de reconocimiento de varias enzimas de restricción. Las enzimas MspI y HpaII reconocen la secuencia CCGG; la primera corta independiente del estado de metilación de la citosina interna, la segunda en cambio, lo hace sólo cuando esta base no está metilada [30].

Se digirieron 5 μ g de cada DNA, con la enzima MspI (10 U/ μ g de DNA) o de HpaII (5 U/ μ g de DNA) (de Bethesda Research Laboratories (BRL)), durante 4 h a 37°C, en los siguientes buffers de digestión: MspI: 50 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreitól y HpaII: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreitól.

Se controló la actividad de las enzimas de restricción incubando 200 ng de DNA del bacteriófago lambda (de Sigma Chemical C.O.), con 10 μ l de la mezcla de digestión

y analizando los productos de digestión por electroforesis en geles de agarosa 1.2% (no mostrado).

8.c. Electroforesis en geles de agarosa :

Los DNA digeridos con las enzimas de restricción MspI y HpaII se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, de 13 x 10 cms, en buffer TBE (55 g ácido bórico, 121.1 g TRIS y 7.4 g EDTA, en un volumen final de 1 l con agua destilada) [84].

Se cargó aproximadamente 1 μ g de DNA digerido por carril, en un volumen final de 10 μ l de buffer de muestra 10X. Se utilizaron como marcadores de tamaño, DNA de los bacteriófagos lambda cortado con la enzima HindIII y ϕ X174 cortado con HaeIII (de Sigma Chemical Co.). Las electroforesis se realizaron en una cámara horizontal de 30 x 21 cms, a 90 V (3 V/cm), por 4 a 5 h, a temperatura ambiente. Se usó como buffer de corrida TBE.

Los geles se tiñeron con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, durante 30 min, en agitación. Se fotografiaron al transiluminador UV y luego se transfirieron a filtros de nitrocelulosa.

8.d. Transferencia de los fragmentos de restricción a nitrocelulosa:

Se denaturó el DNA en una solución 1.5 M NaCl-0.5 M NaOH, por 30 min, en agitación a temperatura ambiente. Se verificó la denaturación por la desaparición de las bandas al observar el gel en el transiluminador UV. Se neutralizó en una solución 0.5 M TRIS-HCl a pH 7.6-1.5 M NaCl, en agitación a temperatura ambiente por 30 min.

Se transfirieron los fragmentos de DNA de cada gel a filtros de nitrocelulosa de las mismas dimensiones, con buffer de transferencia 20 X SSC (175.3 g NaCl, 88.2 g citrato de sodio a pH 7.0 con NaOH 1 N, en un volumen final de 1 l con agua destilada) durante toda la noche a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo de Maniatis y col. [85].

Después de transferir, se lavaron los filtros de nitrocelulosa, 2 veces por 10 min, con buffer 2 X SSC. Se secaron a temperatura ambiente y se colocaron a 80°C por 2 h. Se dejaron enfriar y se guardaron a temperatura ambiente.

8.e. Marcación de DNA con P³² :

Se marcó con dCTP-P³² el DNA de los siguientes clones, provenientes de una genoteca preparada por el Dr. Carlos Frasch, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina : Clon 2, con un inserto de 2.5 Kpb, constituido por una secuencia de DNA de T. cruzi de 36 pb repetida 17 veces y secuencias no repetidas; clon 7, con un inserto de 2.5 Kpb, constituido por una secuencia de DNA de T. cruzi 36 pb repetida 14 veces y secuencias no repetidas; clon 13, con un inserto de 2.2 Kpb, constituido por una secuencia de DNA de T. cruzi de 15 pb repetida 30 veces y secuencias no repetidas; clon 30, con un inserto de 0.65 Kpb, constituido por una secuencia de DNA de T. cruzi de 42 pb repetida 57 veces. Todos estos clones contienen segmentos que codifican para antígenos, algunos de ellos de superficie, del parásito [86]. También se marcó con P³² el DNA nuclear de la cepa Tulahuén, el DNA del fago lambda digerido por Hind III y el de ϕ X174 cortado con HaeIII.

Se utilizó el set para desplazamiento de muesca de BRL para la marcación de cada sonda de DNA. Se agregaron 2.5 μ l de una mezcla de las enzimas DNA polimerasa I (0.4 U/ μ l) y DNasa I (40 pg/ μ l), junto con 25 μ Ci de dCTP- P³² y se llevaron a un volumen final de 25 μ l con agua destilada

estéril. Se incubaron por 1 h a 15°C. Se detuvo la reacción agregando 2.5 μ l de solución de detención (300 mM EDTA a pH 8.0) y enfriando inmediatamente en hielo.

El DNA marcado se separó de los nucleótidos libres a través de columnas de Sephadex G-50, preparadas en pipetas Pasteur. Se tapó el extremo angosto de las pipetas con lana de vidrio siliconizada y se agregó la solución de Sephadex G-50 en buffer TE a pH 8.0, hasta un cm del borde superior. Se cargaron 50 μ g de DNA de espermios de salmón para la saturación de la columna y ésta se lavó con varios volúmenes de buffer TE. Finalmente se cargó la columna con la sonda radiactiva a purificar, se eluyó con buffer TE y se colectaron 13 fracciones de 200 μ l cada una. Se controló en forma rápida la ubicación del DNA marcado mediante un detector Geiger. Luego, se determinó la radiactividad en 2 μ l de cada fracción en el contador de centelleo y se recuperaron aquellas fracciones correspondientes al primer pico de radiactividad.

Inmediatamente antes de su uso, cada sonda se hirvió durante 10 min y se enfrió enseguida en hielo.

8.f. Hibridación :

Se preincubaron 5 filtros en solución de

hibridación - (3X SSC, 0.1% SDS, 5X Deinhardt, 50 µg/ml DNA de espermios de salmón, en un volumen final de 1 l de agua destilada)- , durante 2 h a 65°C, en baño con agitación suave. Se agregaron a cada uno de ellos aproximadamente 10 a 20 millones de cpm de una de las 5 sondas radiactivas, y un millón de cpm de los marcadores fago lambda cortado por HindIII y ϕ X174 cortado por HaeIII. Se incubaron durante toda la noche en esta misma solución a la temperatura señalada.

Se lavó cada filtro en solución 2X SSC-0.1% SDS, a 65°C por 30 min, y luego, 2 veces en solución 0.1 X SSC-0.1% SDS en las mismas condiciones anteriores.

8.g. Exposición y revelado :

Los filtros radiactivos se expusieron con películas autorradiográficas Kodak X-Omat R, en cassettes con pantalla intensificadora, a -70°C, por tiempos que variaron dependiendo de la intensidad de la marca. Las películas se revelaron durante 4 min con revelador Kodak D-11, se lavaron con agua destilada y se fijaron por el mismo tiempo. Posteriormente se enjuagaron en agua destilada y se secaron a temperatura ambiente.

RESULTADOS

1.- Efecto de 5-azacitidina sobre la proliferación de epimastigotes en cultivo :

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de 5-azaC (10^{-5} a 10^{-7} M), en tratamiento continuo, durante 14 días, sobre la proliferación celular de epimastigotes de T. cruzi, cepa Tulahuén, mantenidos en medio Diamond con 2.5% de FBS. Se midió el crecimiento de los cultivos por turbidimetría y por conteo del número de células en algunos días de la curva de crecimiento. Dado que existe correspondencia entre la turbiedad y el número de células, los resultados sólo se expresan en base al primer parámetro de medición.

Los experimentos se realizaron en triplicado de manera que la turbiedad de los cultivos tratados y controles, en cada día de la curva de crecimiento, corresponde al promedio de lectura de 3 matraces diferentes, con desviaciones estándares pequeñas que no alteran el resultado. Los resultados se muestran en la Figura 1. Se observa que la curva de crecimiento de cultivos controles de epimastigotes de T.

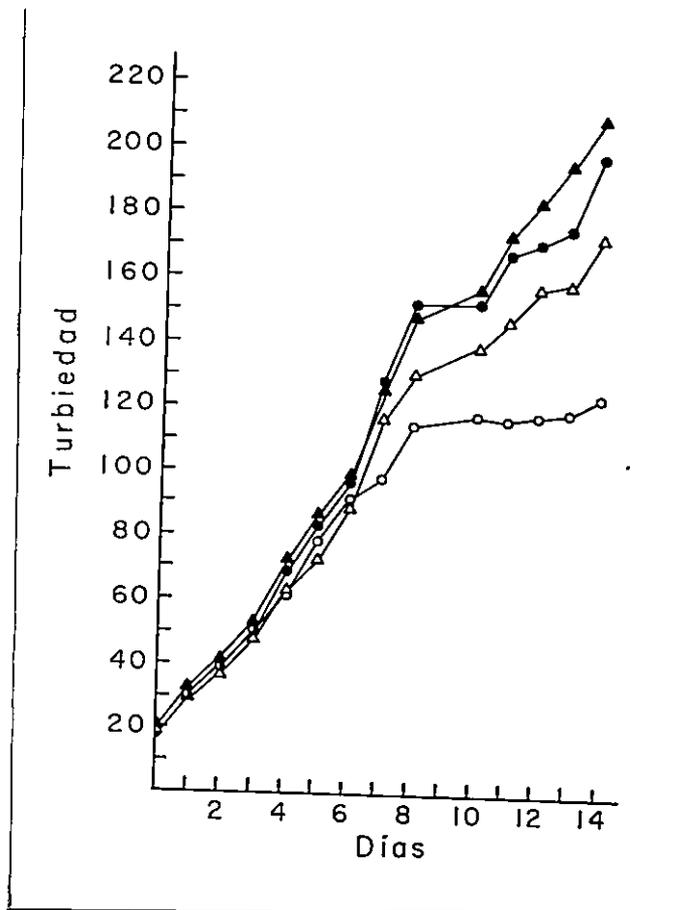


FIGURA 1 : EFECTO DE 5-AZACITIDINA SOBRE LA PROLIFERACION DE EPIMASTIGOTES DE T. cruzi

A 15 millones de células en 10 ml de medio Diamond con 2.5% de FBS, se agregó 5-azaC 10^{-5} a 10^{-7} M. La droga se adicionó cada 24 h durante 14 días. Como controles se utilizaron cultivos sin 5-azaC.

El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría.

▲ 10^{-5} M, △ 10^{-6} M, ● 10^{-7} M, ○ control

cruzi presenta una fase inicial de crecimiento exponencial, en la que hay un aumento en la turbiedad y en el número de células (no mostrado). Hacia el día 8 de cultivo se produce la inflexión de la curva, y los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, en la que tanto la turbiedad como el número de células se mantiene más o menos constante. Por el contrario, las curvas de crecimiento de cultivos tratados con cualquiera de las 3 concentraciones de la droga, no alcanzan la fase estacionaria de crecimiento y se mantienen en crecimiento tipo exponencial durante el tiempo estudiado.

También se estudió el efecto de 10^{-5} a 10^{-7} M de 5-azaC, suministrada en forma continua, durante 7 días, sobre la proliferación de epimastigotes de T. cruzi mantenidos constantemente en fase exponencial de crecimiento. Los resultados se muestran en la Figura 2. Los experimentos se realizaron en triplicado, por lo que cada punto de la figura corresponde al promedio de 3 matraces diferentes. Se grafica el incremento acumulado de turbiedad en función del tiempo y se observa que el crecimiento de los cultivos tratados, con cualquiera de las 3 concentraciones del análogo, es mayor que el de los controles.

Estos resultados indican que 5-azaC promueve la proliferación de los epimastigotes en cultivo, o impide que

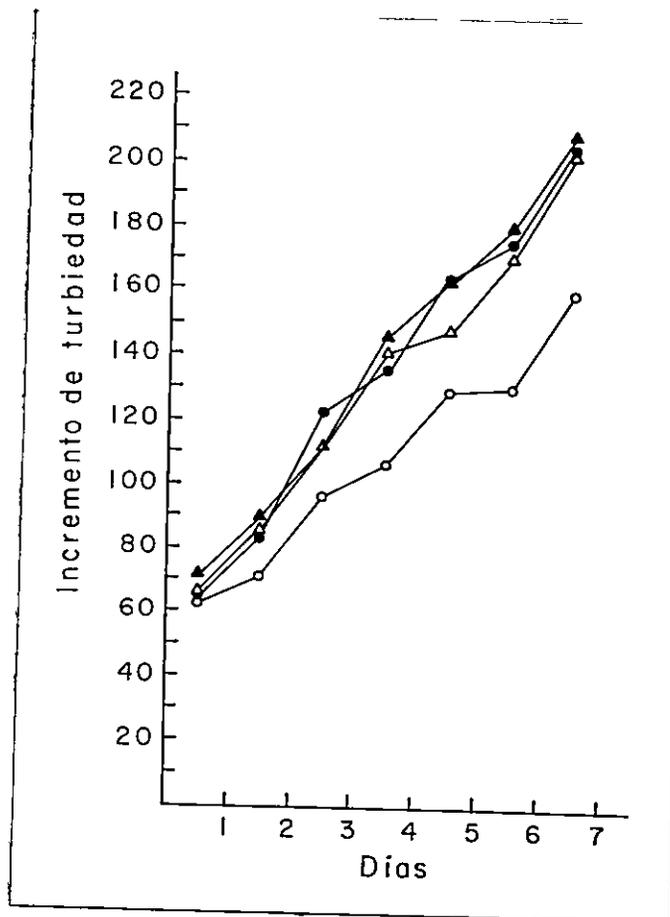


FIGURA 2 : EFECTO DE 5-AZACITIDINA SOBRE UN CULTIVO EXPONENCIAL DE EPIMASTIGOTES DE T. cruzi

A 40 millones de células de cultivos en fase exponencial de crecimiento, en 10 ml de medio Diamond con 2.5% de FBS, se agregó 5-azaC 10^{-5} a 10^{-7} M. La droga se adicionó cada 24 h durante 7 días.

Los cultivos se mantuvieron en fase exponencial, diluyendo diariamente con medio fresco, a la concentración de células y turbiedad del inicio del experimento. Cultivos mantenidos continuamente en fase logarítmica, pero sin exposición a la droga, se usaron como controles.

▲ 10^{-5} M, △ 10^{-6} M, ● 10^{-7} M, ○ control

éstos entren en la fase estacionaria. En consecuencia, este análogo de citosina debiera estimular la síntesis de DNA en los epimastigotes de T. cruzi. Para estudiar esta posibilidad, se midió el efecto de 5-azaC 10^{-6} M sobre la incorporación de timidina [metil- H^3] en el DNA de los parásitos, en las fases exponencial, punto de inflexión y estacionaria de una curva de crecimiento. Las incorporaciones se realizaron en triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Se obtiene una incorporación muy similar del precursor radiactivo en el DNA de células tratadas y controles en la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, hacia la fase estacionaria, la incorporación de timidina [metil- H^3] en el DNA de epimastigotes expuestos a 5-azaC es muy superior, llegando a ser aproximadamente 6 veces mayor que la de los controles, resultado que se reproduce en diferentes experimentos. Este resultado confirma que los cultivos tratados con esta droga se mantienen en activa proliferación. Tanto el incremento en la turbiedad como la incorporación de timidina- H^3 en el DNA en los cultivos tratados con 5-azaC, señalan que éstos no alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, si bien dichos valores son menores que los observados en la fase exponencial propiamente tal.

TABLA 1

EFEECTO DE 5-AZACITIDINA SOBRE LA INCORPORACION DE
TIMIDINA [METIL-H³] EN DNA DE EPIMASTIGOTES DE T. cruzi

Cultivo (fase)	cpm/10 ⁶ células timidina [metil-H ³] en DNA		tratados ----- controles
	Control	5-azaC	
exponencial	386404 ± 12116	366571 ± 6352	0.95
inflexión	64305 ± 4867	142924 ± 5588	2.22
estacionaria	16649 ± 3677	97924 ± 4547	5.88

Cultivos de epimastigotes de T. cruzi en medio Diamond con 2,5% de FBS, se trataron cada 24 h con 10⁻⁶M de 5-azaC por 14 días. En las fases exponencial, de inflexión y estacionaria de la curva de crecimiento, los parásitos se colectaron y resuspendieron en medio condicionado a una concentración de 1.5 x 10⁶ células por ml. Se realizaron incorporaciones en triplicado, por 24 h con 10 µCi de timidina [metil-H³].

2.- Efecto de 5-azacitidina sobre algunos parámetros metabólicos de epimastigotes en cultivo :

Con el propósito de evaluar el efecto de 5-azaC sobre otros aspectos del metabolismo de T. cruzi, se midió su acción sobre la síntesis y cantidad total de RNA y de proteínas, y sobre el consumo de oxígeno en epimastigotes tratados diariamente, por 14 días, con 10^{-6} M de la droga, y controles. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los experimentos se realizaron en triplicado, se presenta el promedio de 3 determinaciones diferentes para cada uno de los parámetros medidos.

La incorporación de uridina- H^3 en el RNA total de los cultivos controles es mayor que en los cultivos tratados con 5-azaC (1.3 veces). Aquella de leucina- H^3 en proteínas y el consumo de oxígeno, en cambio, son mayores en los cultivos expuestos al análogo que en los controles (1.8 y 1.5 veces para el primer y segundo parámetros medidos respectivamente). Los contenidos de RNA y proteínas no se alteran por 5-azaC.

3.- Efecto de 5-azacitidina sobre la diferenciación celular :

Se estudió el efecto de 5-azaC sobre la

TABLA 2

EFECTO DE 5-AZACITIDINA SOBRE ALGUNOS PROCESOS METABOLICOS EN EPIMASTIGOTES DE T. cruzi.

	Incorporación (cpm)		Cantidad total (pg/célula)		Consumo de O ₂ n Atom g x min ⁻¹ 10 ⁶ céls
	Uridina-H ³ 10 ⁶ céls	Leucina-H ³ 10 ⁶ céls	RNA	Proteínas	
Controles	5340	1902.0 ± 157	0.657 ± 0.038	4.38 ± 0.09	0.0575 ± 0.0025
Tratados	3970	3498.4 ± 750	0.697 ± 0.001	4.27 ± 0.07	0.0889 ± 0.0009

Cultivos de epimastigotes de T. cruzi se trataron durante 14 días con 5-azaC 10⁻⁶ M. Cultivos de 14 días sin exposición a la droga se usaron como controles. Alícuotas de 1.5 millones de células en 1 ml de PBS, se incubaron con 50 µCi de uridina-H³ o 10 µCi de leucina-H³ durante 3 h a 28°C. Los resultados se expresaron en cpm/millón de células. Se determinó el contenido total de RNA mediante la técnica de orcinol usando como estándar tRNA de levadura y el de proteínas por el método de Lowry empleando BSA como estándar. Se midió el consumo de oxígeno en alícuotas de 160 millones de células en buffer TRIS-NaCl.

diferenciación desde epimastigotes hacia formas tripomastigotes, en cultivos de T. cruzi controles y tratados diariamente, por 14 días con 10^{-5} a 10^{-7} M del análogo. Los experimentos se realizaron en triplicado. Se realizó un extendido de cada triplicado de los cultivos controles y tratados, de manera que el recuento de las diferentes formas del parásito corresponde al promedio de 3 matraces. No se observaron formas tripomastigotes típicas; sólo un cierto número de parásitos con el kinetoplasto desplazado hacia la parte posterior, a los que denominamos transitorios o intermedios, los que se muestran en la Figura 3. El porcentaje de estas formas y de aquellas epimastigotes, en cultivos y tratados se señala en la Tabla 3.

Las diferencias observadas en el número de formas transitorias entre los cultivos tratados con 5-azaC y los controles no es estadísticamente significativa. Se aplicó la prueba Z de proporciones (valor de Z crítico : 1.96, probabilidad de error α : 0.05) [87] para comparar cada uno de los cultivos tratados en relación al control; se obtuvo valores menores que 1.96, por lo que las diferencias observadas se atribuyeron al azar.

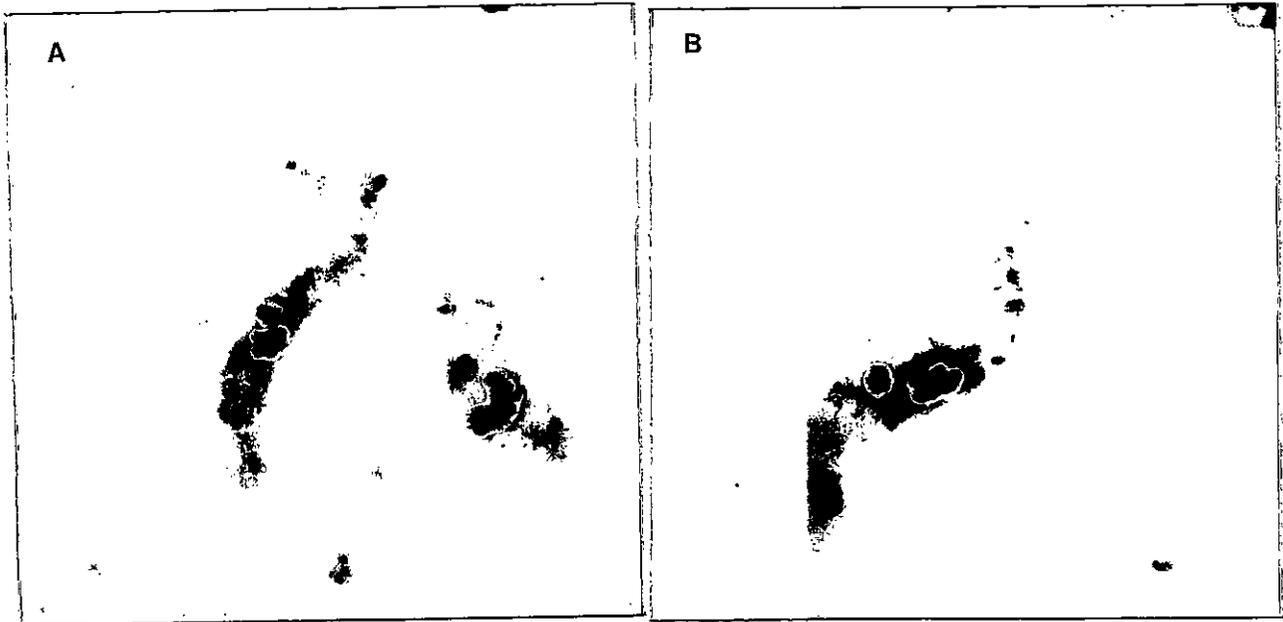


FIGURA 3 : FORMAS EPIMASTIGOTES Y "TRANSITORIAS" DE T. cruzi

A. Formas epimastigotes de T. cruzi.

B. Formas "transitorias" de T. cruzi, con el kinetoplasto desplazado hacia la parte posterior del parásito.

K : kinetoplasto, N : núcleo.

TABLA 3

EFFECTO DE 5-AZACITIDINA SOBRE LA DIFERENCIACION
DE T. cruzi EN CULTIVO

	Formas (%)		
	epimastigotes	transitorias	tripomastigotes
Control	88.9	11.1	0
10 ⁻⁵ M 5-azaC	90.5	9.5	0
10 ⁻⁶ M 5-azaC	90.8	9.2	0
10 ⁻⁷ M 5-azaC	92.0	8.0	0

Cultivos de epimastigotes de T. cruzi, en medio Diamond con 2.5% de FBS, se trataron con 5-azaC 10⁻⁵ a 10⁻⁷ M, cada 24 h, durante 14 días. Cultivos de 14 días sin exposición a la droga se usaron como controles.

Se contaron 1500 células controles y la misma cantidad de parásitos tratados con cada concentración de 5-azaC, en extendidos fijados en metanol al 100% y teñidos con Giemsa al 4%.

Se consideraron formas transitorias aquellas con el kinetoplasto desplazado hacia la parte posterior del núcleo.

4.- Detección de bases metiladas por cromatografía en papel :

Se estandarizaron las condiciones de separación de las bases patrón A, T, C, G, mA y mC, usando 2 sistemas de solventes (butanol 86% - NH₃ 1% e isopropanol 65% - HCl 18%), en cromatogramas unidimensionales. Los valores de R_f obtenidos fueron los siguientes :

Base	Solvente 1	Solvente 2
A	0.33	0.38
mA	0.60	0.53
C	0.20	0.53
mC	0.26	0.59
G	0.10	0.27
T	0.52	0.77

La separación de las bases patrón por cromatografía bidimensional se realizó usando como primer solvente butanol-NH₃ y luego isopropanol-HCl. La migración de las bases patrón en un sistema bidimensional se muestra en la Figura 4.

Se ensayaron diferentes condiciones de hidrólisis

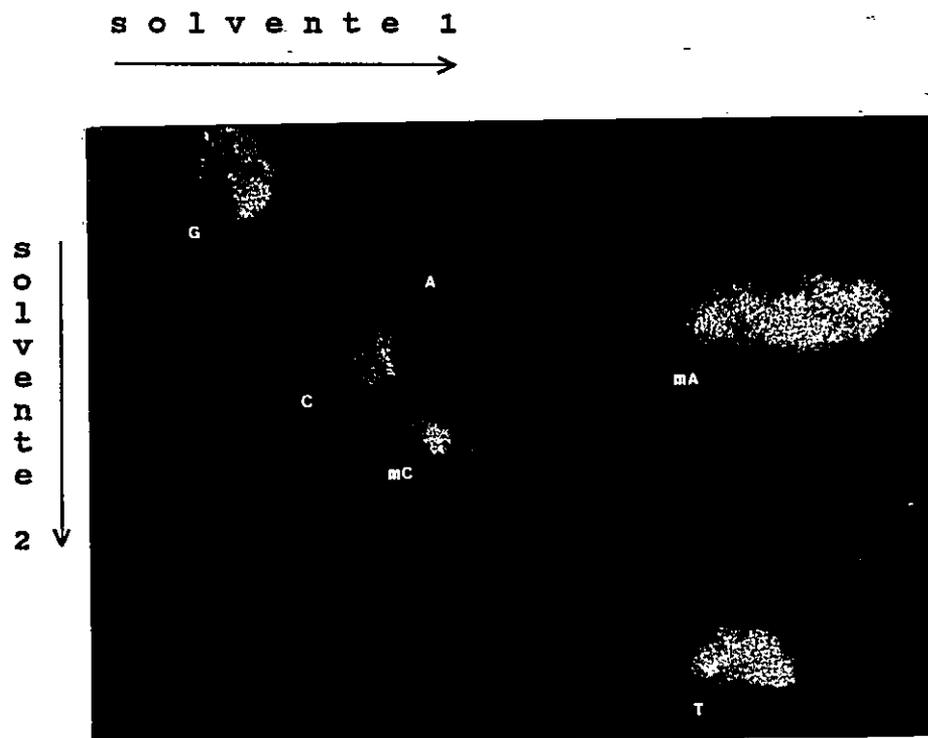


FIGURA 4 : SEPARACION DE BASES PATRONES POR CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL

Solventes : 1^{era} dimensión : butanol 86% - NH₃ 1%
2^{da} dimensión : isopropanol 65% - HCl 18%

G: guanina, C: citosina, T: timina, A: adenina,
mC: 5-metilcitosina y mA: 6-metiladenina

ácida del DNA de T. cruzi, optándose finalmente por el tratamiento en ácido fórmico al 98%, por 30 min. a 175°C. Las bases resultantes de cada ensayo de hidrólisis se observaron al transiluminador UV, y se identificaron comparando su migración con aquella de las bases patrón, separadas por cromatografía en una dimensión en el mismo papel.

Se descartó la hidrólisis con HCl 1 M, por 60 min., a 100°C, porque sólo libera las bases púricas, resultado que concuerda con lo descrito en la literatura [88]. También se desechó la hidrólisis del DNA con PCA al 70%, a 100°C, por diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min), porque no libera timina o lo hace sólo parcialmente; además, este tratamiento presenta complicaciones adicionales tales como: precipitación de $KClO_4$ al neutralizar con KOH, o ataque al papel si no se neutraliza el ácido. Por último, la obtención de una hidrólisis total del DNA de T. cruzi con ácido fórmico al 98%, depende de la temperatura y el tiempo aplicados. Así, el tratamiento a 125°C por 30 min, sólo libera las bases púricas y aquel a 175°C pero por tiempos más cortos, sólo libera guanina, adenina y citosina (resultados no mostrados).

4.a Marcación de adenina y metiladenina por incorporación de adenosina- H^3 :

Alícuotas de 1.5 millones de células, en 1 ml de medio Diamond, se incubaron con 30 μ Ci de adenosina- H^3 y se determinó la radiactividad en el material TCA precipitable. Cuando se obtuvo una incorporación superior a 20.000 cpm por 1.5 millones de células, se extrajo el DNA, junto con aquel de un cultivo de epimastigotes no radiactivo, empleado como acarreador.

Hidrolizados provenientes de diferentes incubaciones con el precursor radiactivo se separaron por cromatografía descendente en una y dos dimensiones, aplicándose siempre entre 10.000 y 33.000 cpm en el papel. Los resultados se muestran en la Tabla 4. No se detecta marca radiactiva en la zona del cromatograma que corresponde a 6mA. Sin embargo, no es posible descartar totalmente la presencia de esta base modificada, pues, puede estar en una proporción muy baja, no medible por esta técnica.

Cabe señalar que las diferencias observadas en la radiactividad correspondiente a adenina, entre los cromatogramas en 1 y 2 dimensiones, se deben a que los hidrolizados separados en cada cromatograma se obtienen a

TABLA 4

ANALISIS DE BASES DEL DNA DE T. cruzi,
 MARCADO CON ADENOSINA-H³, POR
 CROMATOGRAFIA EN UNA Y DOS DIMENSIONES.

Cromatograma	Base	Cpm
Unidimensional	A	6633.6
	mA	0
Bidimensional	A	1399.0
	mA	0

Alicuotas de 1.5×10^6 células se incubaron por 48 h con 15 μ Ci de adenosina-H³. Los DNA se hidrolizaron en ácido fórmico al 98% por 30 min a 175°C. Hidrolizados provenientes de 2 incubaciones diferentes se separaron por cromatografía en una dimensión (solvente butanol 86% - NH₃ 1%) o por cromatografía bidimensional empleando butanol-NH₃ e isopropanol 65% - HCl 18% como 1er. y 2do. solvente, respectivamente.

A : adenina, mA : 6-metiladenina.

partir de cultivos radiactivos de experimentos distintos, los que presentan diferentes incorporaciones del precursor radiactivo.

**4.b. Marcación de bases metiladas por
incorporación de radicales metilo
radiactivos:**

Alícuotas de 1.5 millones de células por ml, se incubaron durante la fase exponencial de crecimiento, con 20 μCi del precursor radiactivo. En el punto de inflexión de la curva, se agregaron 10 μCi adicionales de metionina [metil- H^3] y se incubaron hasta la fase estacionaria de crecimiento. Previo a la hidrólisis del DNA y el análisis por cromatografía, se determinó la incorporación de grupos metilos radiactivos en el material TCA precipitable, obteniéndose siempre una marca de aproximadamente 250000 cpm por 1.5 millones de células, la que se reduce sustancialmente en el hidrolizado del DNA que se aplica en el papel.

En la Tabla 5, se señala la marca radiactiva correspondiente a cada base del hidrolizado de DNA analizado por cromatografía bidimensional. Se detecta radiactividad en la zona del papel que corresponde a citosina-5-metilcitosina, pero no en aquella de 6-

TABLA 5

ANALISIS DE BASES DEL DNA DE T. cruzi, MARCADO CON
 METIONINA [METIL-H³], POR CROMATOGRAFIA
 BIDIMENSIONAL.

Base	cpm
G	0
C/mC	2567
A	89
mA	0
T	567

Alícuotas de 1.5×10^6 células se incubaron con 20 μ Ci de metionina [metil-H³] hasta el día 9 y con 10 μ Ci adicionales hasta el día 12 de cultivo.

El DNA se hidrolizó en ácido fórmico al 98% por 30 min a 175°C.

Las bases se separaron por cromatografía bidimensional usando butanol 86% - NH₃ 1% como 1^{er} solvente e isopropanol 65% - HCl 18% como 2^{do} solvente.

G : guanina, C : citosina, mC : 5-metilcitosina, A : adenina, mA : 6-metiladenina, T : timina.

metiladenina. La radiactividad detectada en timina, se explica porque esta base presenta un grupo metilo en su estructura (5-metiluracilo). Este resultado sugiere la ausencia de metilación en adenina en el DNA de T. cruzi, aunque no se puede descartar que la cantidad de 6mA se encuentre por debajo de la resolución de esta técnica. Más aún, los resultados indican la presencia de 5mC en el DNA del parásito.

4.c. Eliminación de la contaminación del DNA por RNA:

Los hidrolizados de DNA de T. cruzi, analizados por cromatografía en papel y más adelante por HPLC, no presentaron contaminación por bases, nucleósidos o nucleótidos de RNA. Esta aseveración se basa en diferentes observaciones: 1°, no se detecta una mancha que comigre con uracilo, en los hidrolizados de DNA analizados cromatográficamente; 2°, se estima que después de la primera precipitación del DNA con isopropanol, sólo precipita un 2.12% de la uridina inicial, y luego de la segunda precipitación, menos de 0.5% de ésta (estimación realizada en base a experimentos en los que se coprecipitó el DNA con un número conocido de cpm de uridina); y 3°, se obtiene una clara separación de los picos de absorbancia correspondientes a DNA y uridina radiactiva en los DNA purificados por columna

de Sephadex G-50. De esta manera, se obtuvo DNA totalmente libre de ribonucleótidos y ribonucleósidos.

5.- Detección de bases metiladas por HPLC :

Se estandarizaron las condiciones de elución de cada una de las bases patrón A, T, C, G, 6mA y 5mC por separado, y de una mezcla de ellas por HPLC, resultado que se muestra en la Figura 5.

Se utilizó como control positivo un DNA que se sabe presenta 5mC, como es aquel de espermios de salmón. La Figura 6 presenta un hidrolizado de este DNA separado por HPLC; como era esperable, se observa una fuerte señal en la zona de 5mC.

En la Figura 7, se muestra la separación de bases nucleotídicas provenientes de un hidrolizado de DNA obtenido de epimastigotes de T. cruzi cepa Tulahuén, cosechados a los 14 días de cultivo. Se observa una clara señal en la zona de 5mC y un pequeño pico levemente desfasado con respecto a 6mA, cuando se compara con el patrón de elución de los estándares correspondientes (Figura 5), los que fueron separados con el mismo stock de soluciones y las mismas condiciones de preparación de la columna que el hidrolizado de DNA de T. cruzi.

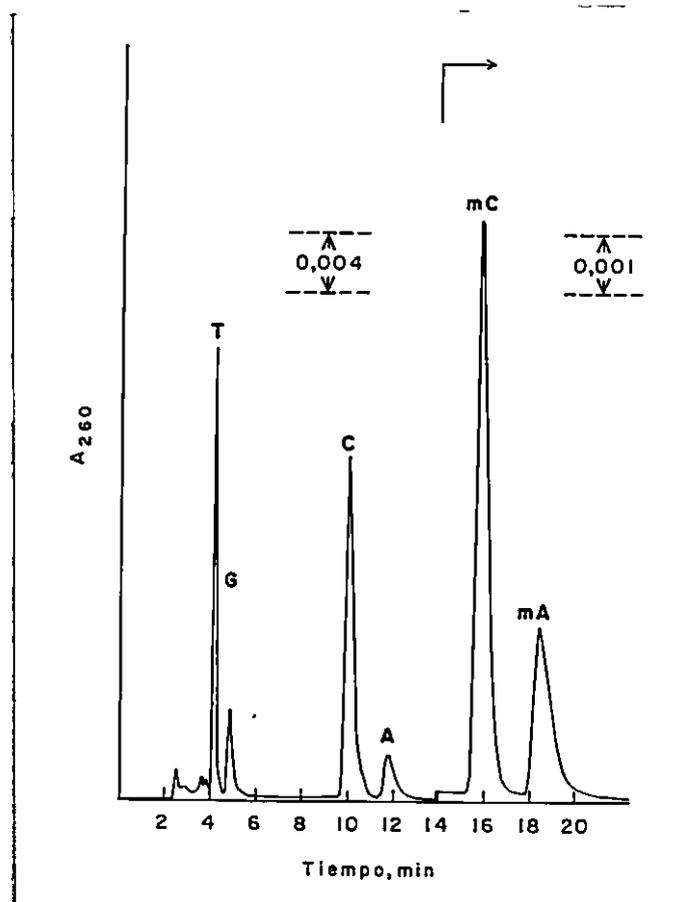


FIGURA 5 : SEPARACION DE BASES PATRONES POR HPLC

Se separó una mezcla de las 6 bases patrones en un gradiente de 0 a 100% de formiato de amonio 20 mM, en 12 % de metanol a pH 4.0, a 40 mM en 20 min a un flujo de 1 ml por min. Se midió la absorbancia a 260 nm en escala 0.08 para bases normales y 0.02 para bases metiladas. La velocidad de corrida del papel fue de 5 mm por min.

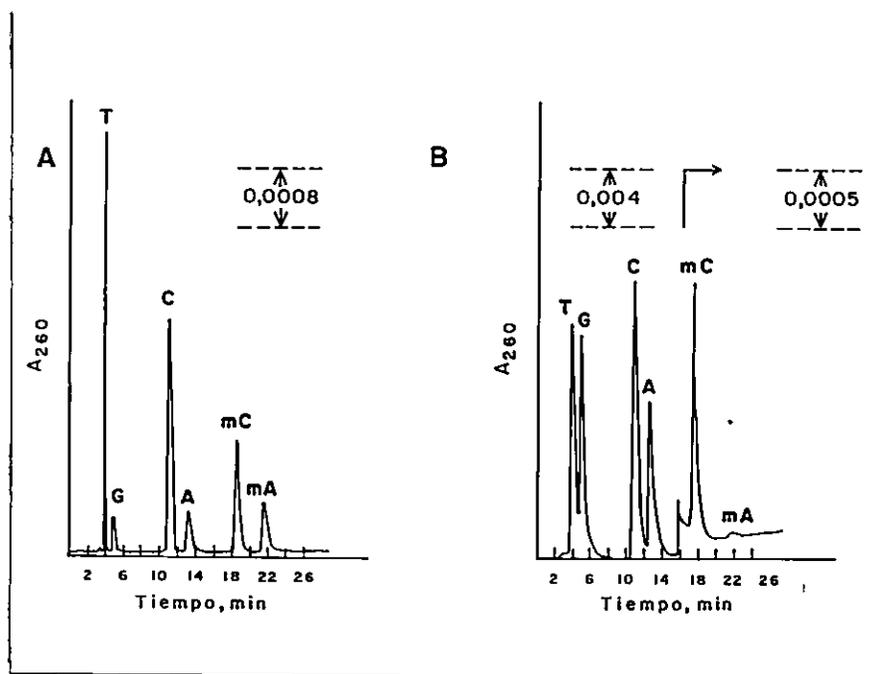


FIGURA 6 : ANALISIS DE BASES DEL DNA DE ESPERMIO DE SALMON POR HPLC

A. Separación de bases estándares.

B. Separación de un hidrolizado de DNA de espermio de salmón.

Se realizó un gradiente de 0 a 100% de solución 20 mM formiato de amonio, en 12% de metanol a pH 4.0, a 40 mM en 20 min a un flujo de 1 ml por min.

Se midió la absorbancia a 260 nm en las escalas 0.16 para las bases patrones, 0.08 y 0.01 para las bases normales y metiladas de DNA de espermios de salmón, respectivamente. La velocidad de corrida del papel fue 2 mm/min.

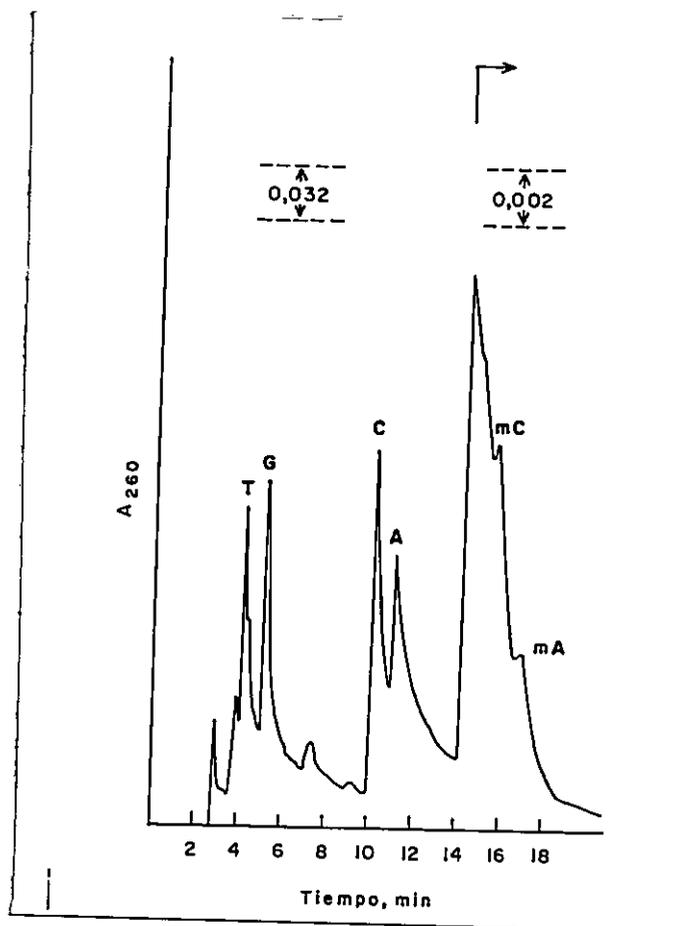


FIGURA 7 : ANALISIS DE BASES DEL DNA_N DE T. cruzi POR HPLC

Se analizó un hidrolizado de DNA de T. cruzi proveniente de parásitos de 14 días de cultivo.

Se realizó un gradiente de 0 a 100 % de formiato de amonio 20 mM a pH 4.0, en 12 % de metanol a 40 mM, en 20 min, a un flujo de 1 ml por min.

Se midió la absorbancia a 260 nm en escala 0.64 para bases normales y 0.04 para bases metiladas.

La velocidad de corrida del papel fue de 5 mm por min.

Ambos picos se detectan en una escala 16 veces más sensible que aquella utilizada para las bases normales. Este resultado, que se reproduce en 2 experimentos diferentes, confirma la presencia de 5mC en el DNA del parásito y más aún, sugiere la presencia de 6mA u otra metiladenina (ver discusión) en el DNA de T. cruzi.

El mismo análisis reportado en la Figura 7, realizado con hidrolizados de DNA de T. cruzi provenientes de cultivos tratados con el agente hipometilante 5-azaC, revela que desaparecen los picos de absorbancia en la zona de las bases metiladas [Figura 8]. Este resultado indica que efectivamente, el análogo de citosina provoca hipometilación del DNA de T. cruzi.

6.- Detección de bases metiladas por digestión del DNA con enzimas de restricción :

Se extrajo el DNA de cultivos de epimastigotes T. cruzi de las cepas Tulahuén chilena (mantenida por 5 y 14 días en medio Diamond con 2.5% de FBS), Tulahuén y RA argentinas, y de tripomastigotes de la cepa RA. El DNA se cuantificó por absorbancia a 260 nm y se controló por electroforesis en geles de agarosa 1%.

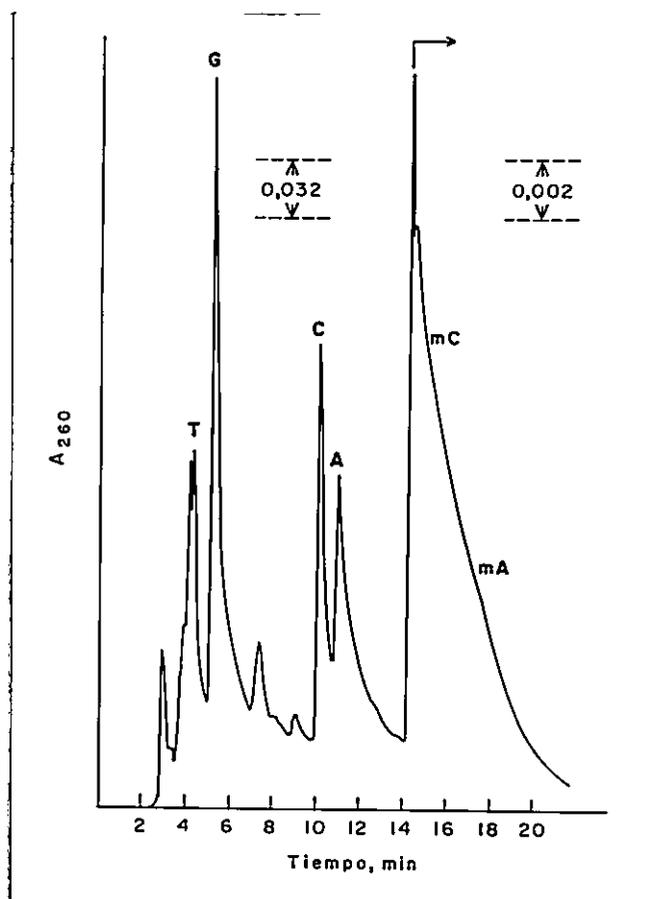


FIGURA 8 : ANALISIS DE BASES DEL DNA_N DE T. cruzi, TRATADO CON 5-AZACITIDINA, POR HPLC

Se analizó un hidrolizado de DNA de T. cruzi, proveniente de parásitos tratados durante 14 días con 5-azaC 10^{-6} M. Se separaron las bases en un gradiente de 0 a 100 % de formiato de amonio 20 mM, en 12 % de metanol a pH 4.0 a 40 mM, en 20 min, a un flujo de 1 ml por min. Se midió la absorbancia a 260 nm en la escala 0.64 para las bases normales y 0.04 para las bases metiladas. La velocidad de corrida del papel fue de 5 mm por min.

Se digirieron los DNA con las enzimas de restricción MspI y HpaII. La actividad de estas enzimas se verificó cortando DNA del bacteriófago lambda.

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 0.8%, cargando 1 μ g de cada DNA digerido por carril, como se muestra en la Figura 9. Se realizaron 5 electroforesis en las mismas condiciones para la posterior transferencia e hibridación con cada una de las 5 sondas radiactivas usadas, las que corresponden a los 4 clones descritos en el punto 8.e (Materiales y Métodos) y al DNA_N total de la cepa Tulahuén. Las Figuras 10 a 14 corresponden a las autorradiografías realizadas utilizando como sonda los clones 2, 7, 13, 30 y DNA_N Tulahuén respectivamente.

No se detectan diferencias en el patrón de bandeo de los DNA digeridos con MspI o HpaII. Tampoco se detectan diferencias entre los estados exponencial (5 días) y estacionario (14 días) en la cepa Tulahuén chilena, ni entre las formas epimastigotes y tripomastigotes de la cepa RA argentina. Por lo tanto, la secuencia metilada no sería CCGG, aunque no se puede descartar que el número de secuencias CmCGG sea menor que el requerido para su detección con estas sondas.

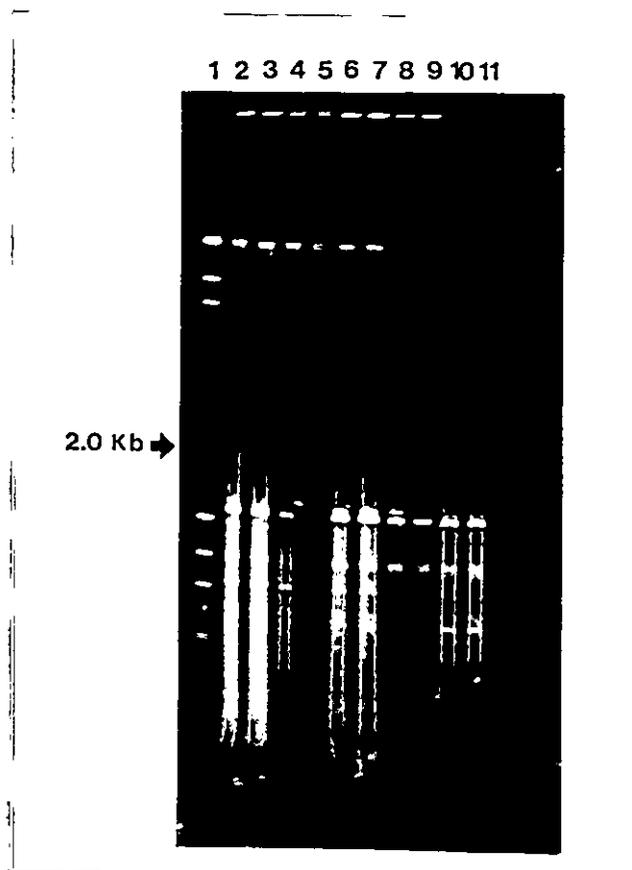


FIGURA 9 : DIGESTION DEL DNA_N DE T. cruzi CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Msp I Y Hpa II.

Carriles :

- 1 : DNA fago lambda x HindIII, DNA fago ϕ X 174 x HaeIII.
- 2,3 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 14 días.
- 4,5 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 5 días.
- 6,7 : DNA epimastigotes T. cruzi (RA).
- 8,9 : DNA tripomastigotes T. cruzi (RA).
- 10,11 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tul 0 argentina).
- 2,4,6,8 y 10 : digeridos con Msp I.
- 3,5,7,9 y 11 : digeridos con Hpa II.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

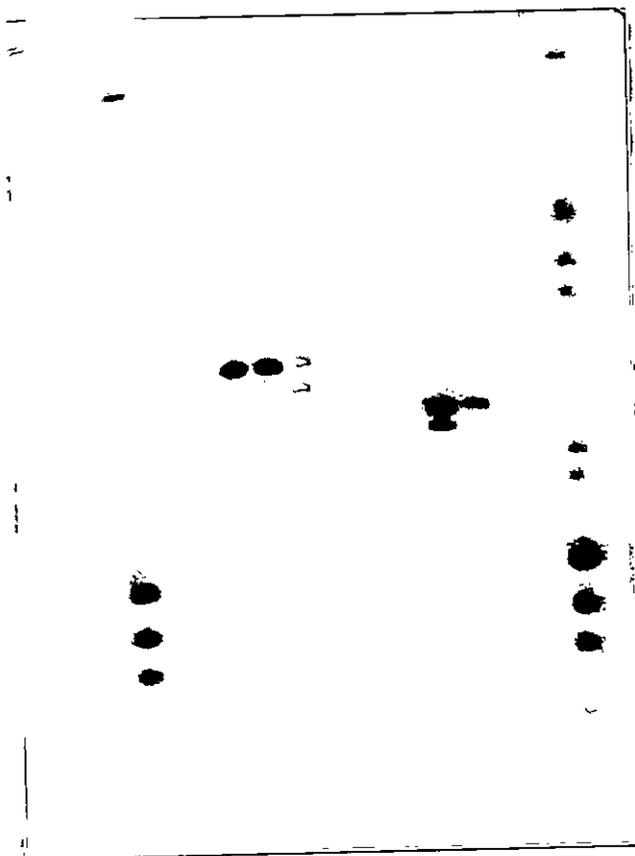


FIGURA 10 : HIBRIDACION DEL CLON 2 A FRAGMENTOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DE DNA DE T. cruzi.

Carriles :

- 1,12 : DNA fago lambda x HindIII, DNA fago ϕ X 174 x HaeIII.
- 2,3 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 14 días.
- 4,5 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 5 días.
- 6,7 : DNA epimastigotes T. cruzi (RA).
- 8,9 : DNA tripomastigotes T. cruzi (RA)
- 10,11 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tul 0 argentina).
- 2,4,6,8 y 10 : digeridos con Msp I.
- 3,5,7,9 y 11 : digeridos con Hpa II.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

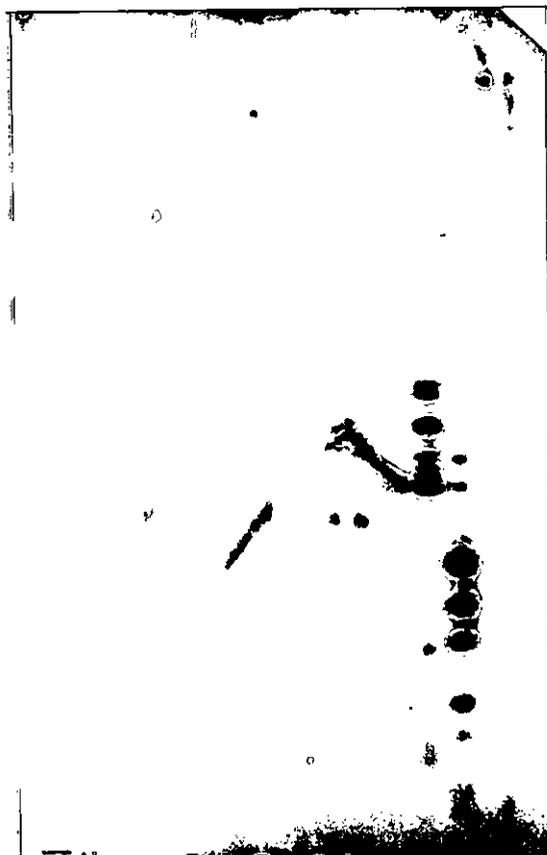


FIGURA 11 : HIBRIDACION DEL CLON 7 A FRAGMENTOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION DE DNA DE T. cruzi.

Carriles :

- 1,2 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 14 días.
- 3,4 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 5 días.
- 5,6 : DNA epimastigotes T. cruzi (RA).
- 7,8 : DNA tripomastigotes T. cruzi (RA).
- 9,10: DNA epimastigotes T. cruzi (Tul 0 argentina).
- 11 : DNA fago lambda x HindIII, DNA fago ϕ X 174 x HaeIII.
- 1,3,5,7 y 9 : digeridos con Msp I.
- 2,4,6,8 y 10 : digeridos con Hpa II.

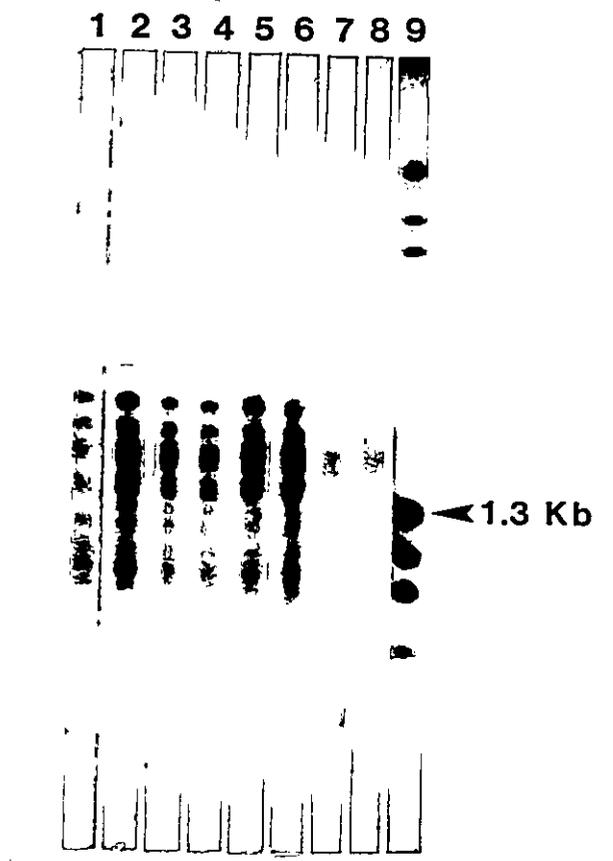


FIGURA 12 : HIBRIDACION DE CLON 13 A FRAGMENTOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DE DNA DE T. cruzi.

Carriles :

- 1,2 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 14 días.
- 3,4 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 5 días.
- 5,6 : DNA epimastigotes T. cruzi (RA).
- 7,8 : DNA tripomastigotes T. cruzi (RA)
- 9 : DNA fago lambda x HindIII, DNA fago ϕ X 174 x HaeIII.
- 1,3,5 y 7 : digeridos con Msp I.
- 2,4,6 y 8 : digeridos con Hpa II.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

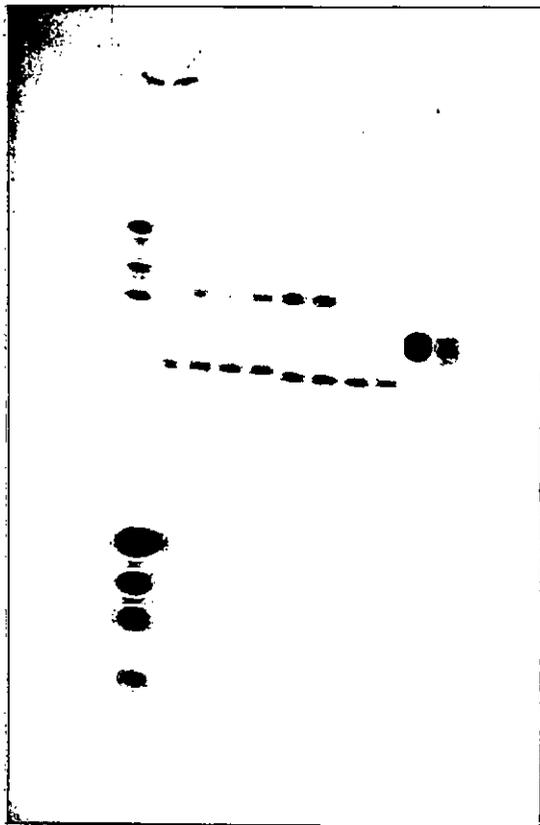


FIGURA 13 : HIBRIDACION DEL CLON 30 A FRAGMENTOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DE DNA DE T. cruzi.

Carriles :

- 1 : DNA fago lambda x HindIII, DNA fago ϕ X 174 x HaeIII.
- 2,3 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 14 días.
- 4,5 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 5 días.
- 6,7 : DNA epimastigotes T. cruzi (RA).
- 8,9 : DNA tripomastigotes T. cruzi (RA)
- 10,11 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tul 0 argentina).
- 2,4,6,8 y 10 : digeridos con Msp I.
- 3,5,7,9 y 11 : digeridos con Hpa II.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

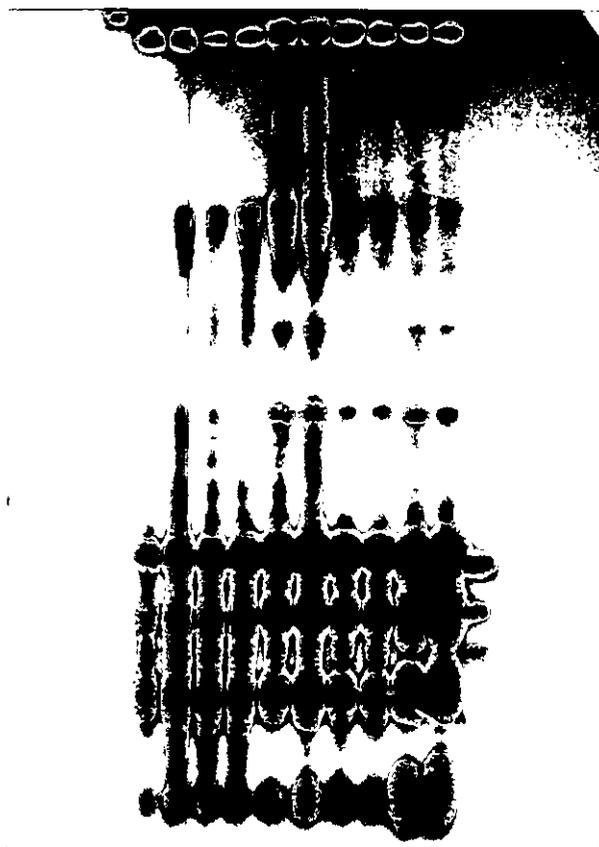


FIGURA 14 : HIBRIDACION DEL DNA NUCLEAR DE LA CEPA TULAHUEN A FRAGMENTOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DE DNA DE T. cruzi.

Carriles :

- 1,2 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 14 días.
- 3,4 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tulahuén), 5 días.
- 5,6 : DNA epimastigotes T. cruzi (RA).
- 7,8 : DNA tripomastigotes T. cruzi (RA).
- 9,10 : DNA epimastigotes T. cruzi (Tul 0 argentina).
- 11 : DNA fago lambda x HindIII, DNA fago ϕ X 174 x HaeIII.
- 1,3,5,7 y 9 : digeridos con Msp I.
- 2,4,6,8 y 10 : digeridos con Hpa II.

DISCUSION

Los resultados presentados en esta tesis constituyen la primera demostración de la presencia de bases metiladas en el DNA de T. cruzi.

Se detectó 5mC en hidrolizados de DNA de epimastigotes del parásito, obtenido de cultivos en la fase estacionaria de crecimiento, tanto a través de HPLC como por cromatografía en papel.

En un trabajo anterior a éste, se había estudiado la composición de bases del DNA de T. cruzi, en hidrolizados ácidos (PCA al 65% por 1 h a 100°C) analizados por cromatografía de capa fina en celulosa. En él se localizaron sólo los 4 residuos principales del DNA y no se detectaron las bases modificadas metilcitosina e hidroximetilcitosina al transiluminador UV [19].

La discrepancia observada entre los resultados de Riou & Pautrizel y los presentados en esta tesis, es atribuible a la baja sensibilidad de la técnica empleada por

estos autores. Así, cuando se analizó la composición de bases del DNA de T. cruzi sometido a las mismas condiciones de hidrólisis con PCA 70% (60 min, 100°C), no se detectó una mancha que comigrara con 5mC al transiluminador UV (resultado no mostrado). Sólo se detecta esta base modificada cuando se marca previamente el DNA con metionina [metil-H³].

El resultado obtenido también constituye la primera evidencia clara de la existencia de residuos metilados en el DNA de tripanosomatídeos. En las especies africanas T. brucei y T. equiperdum, se estudió la presencia de bases modificadas en los DNA hidrolizados enzimáticamente y analizados por HPLC. Inicialmente se sugirió la presencia de un nucleósido modificado en el DNA telomérico de T. equiperdum, pues el análisis de la composición de nucleósidos reveló, por una parte un déficit de 32% de desoxicitidina y por otra, la presencia de un pico extra correspondiente a 1.3% de las bases totales. Sin embargo, por la posición en que migra este nucleósido inusual, se descartó que corresponda a 5mC ni a ningún otro nucleósido conocido [61]. En un trabajo posterior, no se detectó ningún pico significativo (superior al 0.1%), además de aquellos correspondientes a las 4 bases mayores, tanto en el DNA de T. equiperdum como de T. brucei, atribuyéndose el resultado anterior a un artefacto de técnica [64].

Cabe señalar que en estos 2 trabajos, no se menciona que se haya realizado un cambio en la escala de medición de la absorbancia para detectar las bases metiladas. Este alcance es particularmente importante puesto que, en este trabajo, sólo se detectan las bases modificadas en una escala 16 veces más sensible que aquella empleada para medir las 4 bases mayores. Por lo tanto, no se puede descartar que la falta de detección de bases modificadas en el DNA de tripanosomas africanos se deba a un problema metodológico.

De ser efectiva la ausencia de residuos metilados en el DNA de los parásitos africanos, se establecería una clara diferencia entre estos tripanosomas y los americanos. Estos 2 grupos presentan estrategias muy diferentes para la evasión del ataque inmunológico por parte del hospedador, por lo cual podría esperarse que presentaran mecanismos diversos para el control de la expresión génica.

Por otra parte, existen otros organismos en los cuales se describió inicialmente la ausencia de bases metiladas, como es el caso de Drosophila melanogaster [89]. Sin embargo, el desarrollo de una técnica más sensible, como la espectroscopía fotoacústica, ha permitido detectar 0.008% de 5mC, 1 residuo metilado por cada 12500 nucleótidos, en el DNA del insecto [90]. Es posible que el DNA de tripanosomas

africanos presente un contenido muy bajo de bases metiladas, localizadas en puntos altamente estratégicos, no detectables por los métodos convencionales utilizados para estos estudios. También existe la probabilidad que estos organismos presenten mecanismos de regulación totalmente independientes de la metilación del DNA.

Mediante HPLC se detecta un pico de absorbancia que eluye levemente desfasado con respecto a 6mA. Este corresponde a una base metilada pues desaparece con el tratamiento con el agente hipometilante. Esta base modificada no es detectada mediante el análisis cromatográfico uni y bidimensional, de hidrolizados de DNA marcados con adenosina- H^3 y metionina [metil- H^3], respectivamente. Esta base estaría en una cantidad considerablemente menor que 5mC, pues se detecta como un pico más pequeño por HPLC y no alcanza a ser detectada por marcación a través del análisis cromatográfico bidimensional.

Este pico probablemente corresponde a 6mA pues se observa levemente desfasado en relación al estándar; sin embargo, no se puede descartar que corresponda a adenina metilada en una posición diferente al N^6 . Al respecto, esta base podría metilarse potencialmente en la posición 3 (3mA) o aceptar 2 grupos metilo en la posición 6 (6 dimetilade-

nina). Ninguna de estas bases modificadas ha sido detectada en algún organismo hasta la fecha [30].

Se han descrito previamente en la literatura otros eucariontes unicelulares que presentan 5mC y una cantidad menor de 6mA, como es el caso del alga verde Chlamydomonas reinhardi [91]. Sin embargo, también se han descrito organismos unicelulares que presentan sólo metilación en citosina (Euglena gracilis y Saccharomyces cerevisiae [91]) o exclusivamente 6mA (Tetrahymena [36,37] y Paramecium aurelia [92]), por lo cual, cualquiera de las 3 alternativas podría haber sido esperable en el protozoo T. cruzi.

No se cuantificó el contenido de 5mC y de la probable base 6mA en el DNA de T. cruzi. Sin embargo, considerando que el límite de resolución del HPLC es de 0.1 mol % (1 base por cada 1000 nucleótidos) [90], se puede inferir que estas bases están, al menos, en una cantidad superior a la señalada. Al parecer, la cantidad de bases modificadas en el DNA del parásito es baja - detectable sólo en una escala 16 veces más sensible - lo que puede deberse, en parte, al bajo contenido de DNA altamente repetido que presenta T. cruzi [14], que corresponde a la secuencia mayoritariamente metilada en diferentes organismos [32,39].

Se descartó la posibilidad que las bases metiladas provengan del RNA del parásito. En primer lugar, la ocurrencia de una hidrólisis ácida del RNA es un evento poco probable, pues el grupo OH del carbono 2 de la ribosa interfiere con la eliminación de bases desde el RNA [80]. En relación a ésto, no se observan bases uracilo en los hidrolizados de DNA analizados por cromatografía de papel, al transiluminador UV. Por último, se descartó toda posibilidad de contaminación con ribonucleótidos y ribonucleósidos producto de la digestión enzimática con RNAsa, separándolos del DNA mediante columna de Sephadex.

Aparentemente la secuencia CCGG no está metilada en la citosina interna en el DNA de T. cruzi, pues, la digestión con los isoesquizómeros HpaII y MspI determina el mismo patrón de bandeo con ambas endonucleasas de restricción. Sin embargo, no se puede descartar que la metilación en esta secuencia no sea detectada, a pesar de estar presente, ya sea porque CCGG no se encuentre altamente metilada en el DNA del parásito, porque la frecuencia en que está presente esta secuencia sea muy baja en el genoma de este organismo, o por ambas razones.

Se ha descrito que un alto porcentaje de las bases modificadas 5mC están en la secuencia CpG, sin embargo, sólo

una cantidad limitada de estos dinucleótidos se encuentra en la secuencia CCGG. Por lo tanto, la digestión diferencial con las enzimas HpaII y MspI revela sólo una parte de todos los 5mC presentes en una extensión del DNA. Es probable que CpG esté en una secuencia XCGX en el DNA de T. cruzi, reconocida por otras enzimas de restricción o que 5mC se ubique en una secuencia CXG, como se ha descrito en otros organismos [38].

Por otra parte, también es posible que 5mC se encuentre en la secuencia dinucleotídica CA, CT o CG. Al respecto, se ha descrito un cierto número de secuencias mCA, mCT y mCC en el DNA de otros eucariontes, aunque en una proporción significativamente menor que mCG [30].

La digestión con la enzima de restricción MspI también permite inferir que la secuencia CCGG no está metilada en la citosina externa en el DNA del parásito, pues, se ha descrito que esta enzima no corta la secuencia mCCGG [30].

La posibilidad que el DNA de T. cruzi no esté metilado en la secuencia CCGG establecería una clara diferencia con respecto al DNA de diversos organismos, entre ellos el hombre, que presentan una alta frecuencia de metilación de esta secuencia [93].

Tampoco se ha reportado un patrón de bandeo diferente al digerir el DNA de T. brucei con las enzimas HpaII y MspI [62]. Sin embargo, es muy probable que este resultado sea atribuible efectivamente a la ausencia de bases metiladas en el DNA de estos organismos - como se señaló anteriormente - y no a la presencia de 5mC en una secuencia diferente a CCGG. Al respecto, en este organismo se ha detectado digestión parcial de los genes VSG (variantes de glicoproteínas de superficie) teloméricas, al cortar con las endonucleasas HindIII (AAGCTT), PstI (CTGCAG), PvuII (CAGCTG) y SphI (GCATGC), atribuyéndose inicialmente a la presencia de un nucleósido modificado en el dinucleótido GC; sin embargo, estos nucleósidos no han sido identificados, y no hay evidencia de que el residuo C esté metilado dentro del par de bases GC [62,63].

Sería interesante poder detectar la secuencia específica en que se encuentra 5mC en el DNA de T. cruzi, digiriendo con otras enzimas de restricción que contengan mC o mCG en su secuencia de reconocimiento. Al respecto, existen varias enzimas cuya digestión es inhibida por la presencia de 5mC -por ejemplo: HhaI (GCGC), SalI (GTCGAC), XhoI (CTCGAG) [94]- pero no se encuentran isoescuizómeros de ellas, que corten cuando esta base metilada está presente en esas secuencias.

Las enzimas TaqI y Sau3A reconocen la secuencia GATCGA; de ellas, Sau3A corta sólo cuando esta secuencia no está metilada en citosina, en cambio TaqI lo hace independiente de la presencia de 5mC [30]. Sin embargo, dada la probabilidad que esta secuencia de 6 nucleótidos esté representada en una frecuencia muy baja en el DNA del parásito, sería difícil detectar secuencias metiladas empleando este par de isoesquizómeros.

Se ha estimado que la digestión con una enzima que reconoce una secuencia de 4 nucleótidos, permitiría detectar sólo un 6% del total de dinucleótidos CG presentes en el DNA; esta probabilidad es aun menor, sólo 0.4%, si la secuencia de reconocimiento es de 6 nucleótidos [30]. Por esta razón, la factibilidad de detectar metilación en una secuencia específica, por medio del tratamiento con enzimas de restricción, es baja si esta secuencia no está muy representada en el organismo que se estudia.

En un trabajo realizado por otros autores, en el cual se emplean enzimas de restricción para detectar bases metiladas, se señala la ausencia de éstas en el DNA del kinetoplasto de T.cruzi [65]. La digestión del DNA_x proveniente de 8 poblaciones del parásito, con los isoesquizómeros MspI y HpaII, determina el mismo patrón de

bandeo para ambas enzimas, por lo cual los autores infieren que no hay metilación en citosina. Por otra parte, tampoco se detectan diferencias al digerir este DNA con las enzimas DpnI y Sau3AI, que reconocen la secuencia GATC, pero de las cuales DpnI no corta cuando hay metilación en adenina, en cambio Sau3AI lo hace independiente de la metilación de esta base [30,65]. La enzima MboI, que sólo reconoce la secuencia GmATC, no corta el DNA_K del parásito. En base a estos resultados, se sugiere la ausencia de 6mA en este DNA.

Este resultado coincide con datos en la literatura, en relación a la ausencia de metilación en el DNA mitocondrial de otros organismos [95].

El análisis de la composición de bases del DNA de T. cruzi -obtenido de cultivos tratados diariamente hasta la fase estacionaria de crecimiento con 5-azaC- por HPLC, revela que desaparece el pico de absorbancia correspondiente a 5mC y aquel que probablemente corresponde a 6mA. Este resultado demuestra claramente que la droga produce hipometilación del DNA. Además, constituye una evidencia positiva de que el pico de absorbancia desfasado con respecto a 6mA puede corresponder efectivamente a una base adenina metilada, pues desaparece cuando se tratan los parásitos con 5-azaC.

En esta tesis se demuestra que el tratamiento continuo de cultivos de T. cruzi con 5-azaC estimula la proliferación celular. Este efecto se detecta tanto por un aumento en la incorporación de timidina [metil- H^3] en el DNA, como por el aumento del número de células y el incremento correspondiente en la turbiedad del cultivo. Este resultado se observa tanto en los cultivos en crecimiento normal como en aquellos mantenidos en crecimiento exponencial constante.

Los cultivos tratados diariamente, por 14 días, con 5-azaC, no alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, manteniéndose un aumento del número de células y la turbiedad de los cultivos. La incorporación de timidina [metil- H^3] en el DNA de los parásitos tratados con 5-azaC, comparado con aquella de los parásitos controles, tanto en la fase de inflexión como principalmente en la fase estacionaria de la curva de crecimiento, indican que los cultivos expuestos a la droga mantienen una activa síntesis de DNA. Las curvas de crecimiento de los cultivos expuestos al análogo se mantienen en un crecimiento tipo exponencial, si bien los valores de turbiedad e incorporación de timidina- H^3 son menores que los de la fase exponencial propiamente tal. Este comportamiento recuerda al de células transformadas, que se mantienen en crecimiento exponencial, mientras las de células normales entran en fase estacionaria. Cabe señalar que las células

transformadas se encuentran mayoritariamente hipometiladas en citosina [55,56].

En general, se ha descrito bajos niveles de 5mC en varios tumores y líneas celulares tumorales. Por ejemplo, se ha establecido que el contenido de 5mC en los DNA nucleares de hígado y mucosa pilórica normales, es mayor que aquel de tejidos hepáticos o de estómago premalignos o malignos inducidos por agentes químicos, y que la hipometilación de estos últimos tejidos es mayor que la esperada para efectos de replicación solamente [55,56]. Estos resultados sostienen que células en activa proliferación, como son las células tumorales, están hipometiladas en citosina.

Por otra parte, en algunos casos se ha demostrado que la transformación celular por oncogenes, sólo se produce cuando éstos están demetilados y se transcriben activamente. Así por ejemplo, la metilación in vitro del fragmento BamHI del oncogen Ha-ras humano, reduce significativamente la capacidad transformante de este oncogén en células transfectadas por el plásmido que lleva dicho fragmento. Además, se ha demostrado que el posterior tratamiento con 5-azaC de las células transfectadas, restaura totalmente la actividad transformante del oncogén Ha-ras [96]. Sin embargo, esta correlación no siempre ocurre pues se ha establecido que

la activación del oncogén c-abl en células tumorales, puede ocurrir aún en presencia de una metilación extensiva del sitio CCGG en la secuencia del oncogén [97].

Las evidencias presentadas en esta tesis, de que el mismo tratamiento con 5-azaC determina por una parte, la hipometilación del DNA de T. cruzi y por otra la activación de la proliferación celular de epimastigotes en cultivo, permiten correlacionar ambos efectos. Es factible proponer que la metilación del DNA participa en la regulación de la proliferación celular en T. cruzi, pues, sólo aquellos cultivos tratados con 5-azaC y en los cuales el DNA de los parásitos está hipometilado, se mantienen en activa proliferación. Probablemente 5-azaC esté activando, por hipometilación, genes que participan directamente en la proliferación celular de este organismo o genes reguladores de los anteriores. En consecuencia, se puede predecir que el ingreso de las células a la fase estacionaria de crecimiento, se correlaciona con la metilación de ciertos sitios en determinados genes del parásito.

El mecanismo por el cual 5-azaC estimula la proliferación celular es materia de especulación. No se ha estudiado específicamente genes que se encuentren hipometilados en el DNA de parásitos tratados con 5-azaC, y

en cambio, estén metilados en el genoma de parásitos controles. Al respecto, existen numerosos genes blancos potenciales de la droga, cuya expresión podría ser estimulada en condiciones de activa proliferación, los cuales serían factibles de ser estudiados a través de este enfoque, siempre y cuando éstos estuviesen clonados y se dispusiese al menos de una sonda heteróloga de ellos.

En un trabajo posterior, se podría analizar algun(os) gen(es) que participa(n), por ejemplo, en la síntesis de DNA (timidina quinasa, timidilato sintasa); o bien, los genes para algunos factores de transcripción, RNA polimerasa II, tubulinas o RNAr, entre otros, los cuales deberían estar expresándose activamente en asociación con una activa proliferación.

Los resultados obtenidos al medir el efecto del tratamiento con 5-azaC sobre la diferenciación de los parásitos en cultivo, desde la forma epimastigote replicativa hacia aquella tripomastigote no replicativa, sugieren que no existe una relación entre la hipometilación del DNA y la transformación del parásito. La diferencia observada en el número de formas con el kinetoplasto desplazado hacia la parte posterior del núcleo (transitorias), entre los cultivos controles y tratados, no es significativa aplicando la prueba

estadística Z de proporciones.

Era esperable que 5-azaC no indujera mayor diferenciación desde epimastigotes a tripomastigotes en cultivo, pues, los resultados obtenidos en relación a proliferación del T. cruzi, señalan que el tratamiento con el análogo impide que los parásitos tratados abandonen el ciclo proliferativo para diferenciar hacia la forma no replicativa tripomastigote.

Sin embargo, para corroborar este resultado, sería apropiado estudiar el efecto de 5-azaC sobre la diferenciación de una cepa o clon de T. cruzi que presente un mayor porcentaje de transformación espontánea en cultivo. Al respecto, existen otras cepas mantenidas de rutina en nuestro laboratorio, cuya diferenciación hacia formas tripomastigotes típicas aumenta a medida que transcurre el mayor número de días de cultivo (clon Dm 28c-brasilero y cepa San Carlos-colombiana). La cepa Tuluahuén presenta un índice muy bajo de diferenciación a tripomastigote; normalmente no se observan formas infectivas, aún en cultivos en la fase estacionaria de crecimiento; por lo tanto, la baja transformación per se de esta cepa podría enmascarar el efecto de 5-azaC sobre la diferenciación.

El consumo de oxígeno aumenta en los cultivos tratados diariamente con 5-azaC. Este incremento puede reflejar un metabolismo más activo en las células expuestas al análogo, probablemente debido a la mantención del estado proliferativo. Los contenidos de RNA y proteínas no son afectados por el tratamiento con 5-azaC.

La incorporación de uridina- H^3 en el RNA está disminuída en cultivos tratados con el agente hipometilante. En la literatura se ha descrito que 5-azaC altera la actividad de algunas enzimas que participan en la biosíntesis, de UTP [98]. Si bien la incorporación de uridina- H^3 involucra el patrón salvaje de síntesis de este nucleótido, no se puede descartar que 5-azaC altere la síntesis de novo del UTP no radiactivo que puede estar incorporándose en el RNA recién sintetizado. Al respecto, no se conoce si T. cruzi presenta el mismo patrón de biosíntesis de UTP de otros tipos celulares en los cuales se ha descrito la alteración por 5-azaC. Alternativamente, el análogo pudiera estar alterando sólo la velocidad de recambio del RNA, lo que estaría dando cuenta de las diferencias en la incorporación de este precursor radiactivo.

Por otra parte, la incorporación de leucina- H^3 en proteínas está aumentada en parásitos expuestos a 5-azaC. En

otros tipos celulares, se ha descrito que este análogo inhibe la síntesis de proteínas porque altera el procesamiento del rRNA y disminuye la capacidad aceptora de aminoácidos del tRNA [99]; esta situación no ocurriría en T. cruzi, indicando que la droga tiene efectos diferentes sobre distintos tipos celulares.

Los resultados de la Tabla 2 en conjunto señalan que 5-azaC no tiene un efecto tóxico sobre los parásitos. Al respecto, el aumento del consumo de O₂ de los cultivos tratados con el análogo indica que no se ha afectado en forma negativa el metabolismo de las células. Por otra parte, el examen a microscopía de luz, revela que no hay cambios en la movilidad y morfología en los parásitos tratados comparados con los controles.

Los contenidos de RNA y de proteínas por célula, estimados en parásitos de la cepa Tulahuén, en la fase estacionaria de crecimiento, han sido comparados con aquellos descritos en la literatura para la cepa Y de T. cruzi [18]. La medición del contenido de proteínas por célula, utilizando el mismo método de determinación arroja resultados coincidentes para ambas cepas (4.38 pg para la cepa Tulahuén vs 4.20 pg para la cepa Y). Sin embargo, el contenido de RNA estimado para la cepa Y (0.157 pg) está por debajo de aquel

determinado para la cepa Tulahuén. La diferencia puede estar dada porque se emplean diferentes métodos de extracción del RNA pues, ambas determinaciones se realizan por el método del orcinol. El método de Ogur y Rosen, utilizado para la extracción del RNA de la cepa Y, incluye el tratamiento con PCA 1 N en frío. Se ha descrito que esta técnica no es adecuada para la extracción total del RNA, al menos a partir de tejidos [100]. El método de Schneider empleado en esta tesis, que incluye el tratamiento con TCA 5 % en caliente, permite obtener una extracción más completa del RNA total. No se puede descartar, sin embargo, que la diferencia en el contenido de RNA por célula entre ambas cepas, corresponda a una característica propia de cada una de ellas.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se concluye que:

- 5mC y muy probablemente 6mA están presentes en el DNA de la forma epimastigote de T. cruzi cepa Tulahuén.
- 5-azaC induce la hipometilación del DNA en este estado del parásito.
- 5-azaC estimula la proliferación de los parásitos en cultivo e impide que éstos alcancen la fase estacionaria de crecimiento.
- 5-azaC no tiene un efecto tóxico sobre los cultivos de epimastigotes de T. cruzi.

Se propone que la proliferación de este parásito está al menos en parte regulada por la metilación del DNA.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Molineux, D.H. and Ashford, R.W. (1983). Chagas' disease and trypanosomiasis outside Africa. In "The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals". (Taylor and Francis Ltd.) pp 3-62.
- 2.- Molineux, D.H. and Ashford, R.W. (1983). Chagas' disease and trypanosomiasis outside Africa. In "The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals". (Taylor and Francis Ltd eds.) pp 161-182.
- 3.- Fife Jr, E.H. (1977). Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. In "Parasitic protozoa " Vol I. Taxonomy, kinetoplastids and flagellates of fish. (Kreier J.P. ed.) pp 135-173. Acad. Press, New York.
- 4.- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen, n. sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.

- 5.- Apt, W. y Reyes, H. (1986). Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile. I. Distribución geográfica, índices de infección en vectores y en humanos. *Parasitol. al Día* 10, 94-101.
- 6.- Brener, Z. (1986). Why vaccines do not work in Chagas disease?. *Parasitol. Today* 2, 196-197.
- 7.- De Souza, W. (1984). Cell biology of Trypanosoma cruzi. *Int. Rev. Cytol.* 86, 197-283.
- 8.- Brener, Z. (1973). Biology of Trypanosoma cruzi. *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 347-382.
- 9.- Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. (1987). Trypanosoma cruzi populations : more clonal than sexual. *Parasitol. Today* 3, 189-190.
- 10.- Morel, C.N., Deane, M.P. and Gonçalves, A.M. (1986). The complexity of Trypanosoma cruzi populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol. Today* 2, 97-100.
- 11.- Dvorak, J.A. (1984). The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi : biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* 24, 357-371.

- 12.- Tibayrenc, M. (1985). On the microdistribution and sexuality of Trypanosoma cruzi. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 79, 882-883.
- 13.- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Dedet, J-D, Poch, O. and Desjeux, P. (1985). New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas' disease. Genetica 67, 223-230.
- 14.- Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa : genomic organization, transcription, replication and evolution. Ann. Rev. Microbiol. 41, 363-382.
- 15.- Englund, P.T., Hajduk, S.L. and Marini, J.C. (1982). The molecular biology of Trypanosomes. Ann. Rev. Biochem. 51, 695-726.
- 16.- Fernandes, J.F. and Castellani, O. (1966). Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 18, 195-202.

- 17.- Riou, G. and Pautrizel, R. (1969). Nuclear and kinetoplasmic DNA from trypanosomes. *J. Protozool.* 16, 509-513.
- 18.- Lanar, D.E., Levy, L.S. and Manning, J.E. (1981). Complexity and content of DNA and RNA in Trypanosoma cruzi. *Molec. Biochem. Parasitol.* 3, 327-341.
- 19.- Castro, C., Craig, S.P. and Castañeda, M. (1981). Genome organization and ploidy number in Trypanosoma cruzi. *Molec. Biochem. Parasitol.* 4, 273-282.
- 20.- Astolfifilho, S., Martins, C. and Gander, E. (1980). On the chromatin structure of Trypanosoma cruzi. *Molec. Biochem. Parasitol.* 1, 45-53.
- 21.- Toro, G.C. and Galanti, N. (1988). H1 histone and histones variants in Trypanosoma cruzi. *Exp. Cell Res.* 174, 16-24.
- 22.- Toro, G.C. and Galanti, N. (1990). Trypanosoma cruzi histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. *Biochem. Internatl.* 21, 481-490.

- 23.- Toro, G.C., Wernstedt, C., Medina, C., Jaramillo, N., Hellman, U. and Galanti, N. (1992). Extremely divergent histone H4 sequence from Trypanosoma cruzi: evolutionary implications. J. Cell. Biochem. 49, 266-271.
- 24.- Solari, A.J. (1980). The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in Trypanosoma cruzi. Chromosoma 78, 239-255.
- 25.- Gibson, W.C. and Miles, M.A. (1986). The karyotype and ploidy of Trypanosoma cruzi. EMBO J. 5, 1299-1305.
- 26.- Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J.E. and Kirchhoff, L.V. (1987). Trypanosoma cruzi exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. Molec. Biochem. Parasitol. 22, 115-123.
- 27.- Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R.A., Franke de Cazzulo, B.M., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C.C. and Petterson, U. (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in Trypanosoma cruzi. Molec. Biochem. Parasitol. 42, 213-224.

- 28.- Ceron, C.R., De Araujo Caldas, R., Felix, C.R, Mundim, M.H. and Roitman, I. (1979). Purine metabolism of Trypanosomatids. J. Protozool. 26, 479-483.
- 29.- Gutteridge, W.E. and Gaborak, M. (1979). A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the three main forms of Trypanosoma cruzi. Int. J. Biochem. 10, 415-422.
- 30.- Doerfler, W. (1983). DNA methylation and gene activity. Ann. Rev. Biochem. 52, 93-124.
- 31.- Wigler, M.H. (1981). The inheritance of methylation patterns in vertebrates. Cell 24, 285-286.
- 32.- Razin, A. and Riggs, A.D. (1980) DNA methylation and gene function. Science 210, 604-610.
- 33.- Naveh-Manly, T. and Cedar, H. (1981). Active gene sequences are undermethylated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4246-4250.
- 34.- Chomet, P.S. (1991). Cytosine methylation in gene-silencing mechanisms. Current Opinion Cell Biol. 3, 438-443.

- 35.- Thompson, J.P., Simkevich, C.P., Holness, M.A., Kang, A.H. and Rayhow, R. (1991). In vitro methylation of the promoter and enhancer of Pro α 1 (I) collagen gene leads to its transcriptional inactivation. *J. Biol. Chem.* 266, 2549-2556.
- 36.- Pratt, K. and Hattman, S. (1981). Deoxyribonucleic acid methylation and chromatin organization in Tetrahymena thermophila. *Molec. Cell. Biol.* 1, 600-608.
- 37.- Gorovsky, M.A., Hattman, S. and Pleger, G.L. (1973). [⁶N] methyladenine in the nuclear DNA of a eukaryote, Tetrahymena pyriformis. *J. Cell. Biol.* 56, 697-701.
- 38.- Gruenbaum, Y., Naveh-Manly, T., Cedar, H. and Razin, A. (1981). Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292, 860-862.
- 39.- Selke, E.U. (1990). DNA methylation and chromatin structure: a view from below. *TIBS* 15, 103-107.
- 40.- Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

- 41.- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261-282.
- 42.- Tazi, J. and Bird, A.P. (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60, 909-920.
- 43.- Razin, A. and Cedar, H. (1984). DNA methylation in eukaryotic cells. *Int. Rev. Citol.* 92, 159-185.
- 44.- Baserga, R., Waechter, D.E., Soprano, K.J. and Galanti, N. (1982). Molecular biology of cell division. *Ann. New York Acad. Sci.* 397, 110-120.
- 45.- Wölfl, S., Schröder, M. and Wittig, B. (1991). Lack of correlation between DNA methylation and transcriptional inactivation: The chicken lysozyme gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 271-275.
- 46.- Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. and Bird, A.P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58, 499-507.

- 47.- Boyes, J. and Bird, A.P. (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64, 1123-1134.
- 48.- Dynan, W.S. (1989). Understanding the molecular mechanism by which methylation influences gene expression. *TIG* 5, 35-36.
- 49.- Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J. and Cedar, H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44, 535-543.
- 50.- Wigler, M., Levy, D. and Perucho, M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. *Cell* 24, 33-40.
- 51.- Adams, R.L.P., Davis, T., Fulton, J., Kirk, D., Qureshi, M. and Burdon, R.H. (1984). Eukaryotic DNA methylase-properties and action on native DNA and chromatin. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 108, 143-156.
- 52.- Cedar, H. and Razin, A. (1990). DNA methylation and development. *Biochim. Biophys. Acta* 1049, 1-8.

- 53.- Gjerset, R.A. and Martin, Jr., D.W. (1982). Presence of a DNA demethylating activity in the nucleus of murine erythroleukemic cells. *J. Biol. Chem.* 257, 8581-8583.
- 54.-- Migeon, B.R., Holland, M.M., Driscoll, D.J. and Robinson, J.C. (1991). Programmed demethylation in CpG islands during human fetal development. *Somatic Cell Molec. Genetics* 17, 159-168.
- 55.- Lapeyre, J-N. and Becker. F.F. (1979). 5-methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 87, 698-705.
- 56.- Ichinose, M., Miki, K., Furihata, Ch., Tatematsu, M., Ichihara, Y., Ishihara, T., Katsura, I., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Tanji, M., Oka, H., Matsushima, T. and Takahashi, K. (1988). DNA methylation and expression of the rat pepsinogen gene in embryonic, adult and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 48, 1603-1609.
- 57.- Hsiao, W.W-L., Gattoni-Celli, S. and Weinstein, I.B. (1985). Effects of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation. *Molec. Cell. Biol.* 5, 1800-1803.

- 58.- Jones, P.A. (1986). DNA methylation and cancer. *Cancer Res.* 46, 461-466.
- 59.- Razin, A., Webb, C., Szyf, M., Yisraeli, J., Rosenthal, A., Naveh-Many, T., Sciaky-Gallili, N. and Cedar, H. (1984). Variations in DNA methylation during mouse differentiation in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2275-2279.
- 60.- Taylor, S.M., Constantinides, P.A. and Jones, P.A. (1984). 5-azacytidine, DNA methylation and differentiation. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 108, 115-127.
- 61.- Raiaud, A., Gaillard, C., Longacre, S., Hibner, U., Buck, G., Bernardi, G. and Eisen, H. (1983). Genomic environment of variant surface antigen genes of Trypanosoma equiperdum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4306-4310.
- 62.- Bernards, A., Van Harten-Loosbroek, N. and Borst, P. (1984). Modification of telomeric DNA in Trypanosoma brucei; a role in antigenic variation?. *Nucl. Acids Res.* 12, 4153-4170.

- 63.- Pays, E., Delauw, M., Laurent, M., and Steinert, M.
(1984) Possible DNA modification in GC dinucleotides of Trypanosoma brucei telomeric sequences; relationship with antigen gene transcription. Nuc. Acids Res. 12, 5235-5247.
- 64.- Crozatier, M., Jan de Brij, R., Engelse, L.D., Johnson, P.J. and Borst, P. (1988). Nucleoside analysis of DNA from Trypanosoma brucei and Trypanosoma equiperdum. Molec. Biochem. Parasitol. 31, 127-132.
- 65.- Muñoz, S., Venegas, J. and Solari, A. (1991). Evidence of absence of Trypanosoma cruzi kinetoplast DNA methylation by restriction endonuclease analysis. Int. J. Parasitol. 21, 863-866.
- 66.- Santi, D.V., Garrett, C.E. and Barr, P.J. (1983). On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. Cell 33, 9-10.
- 67.- Freidman, S. (1981). The inhibition of DNA (cytosine-5) methylases by 5-azacytidine : The effect of azacytosine-containing DNA. Mol. Pharmacol. 19, 314-320.

- 68.- Santi, D.V., Norment, A. and Garrett, C.E. (1984).
Covalent bond formation between a DNA-cytosine
methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA 81, 6993-6997.
- 69.- Jones, P.A. (1985). Altering gene expression with 5-
azacytidine. Cell 40, 485-486.
- 70.- Jaenisch, R., Schnieke, A. and Harbers, K. (1985).
Treatment of mice with 5-azacytidine efficiently
activates silent retroviral genomes in different
tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 1451-1455.
- 71.- Diamond, L.S. (1968). Improved method for the
monoaxenic cultivation of Entamoeba histolytica
Schaudinn (1903) and E.histolytica like amoebae with
trypanosomatids. J. Parasitol. 54, 715-719.
- 72.- Schneider, W. (1957). Determination of nucleic acids in
tissue by pentose analysis. In " Methods in enzymology
" Vol. III, (Colowick, S. and Kaplan, N. eds.) pp.
680-683. Acad. Press, New York.

- 73.- I-San Lin, R. and Schjeide, O.A. (1969). Micro estimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction. *Analytical Biochem.* 27, 473-483.
- 74.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 75.- Lessler, M. and Brierley, G.P. (1969). Oxygen electrode measurements in biochemical analysis. *Methods Biochem. Anal.* 17, 1-27.
- 76.- Van der Ploeg, L., Bernardis, A., Rijsewijk, F. and Borst, P. (1982). Characterization of the duplication-transposition that controls the expression of two genes for variant surface glycoproteins in Trypanosoma brucei. *Nuc. Acids Res.* 10, 593-609.
- 77.- Fairlamb, A., Weislogel, P., Hoeijmakers, J. and Borst, P. (1978). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of Trypanosoma brucei. *J. Cell Biol.* 76, 293-309.

- 78.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).
Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring
Harbor Laboratory, pp 464-465.
- 79.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).
Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring
Harbor Laboratory, pp 468.
- 80.- Wyatt, G. (1951). The purine and pyrimidine composition
of deoxypentose nucleic acids. *Biochem. J.* 48, 584-590.
- 81.- Hattman, S. (1970). DNA methylation of T-even
bacteriophages and of their nonglycosylated mutants: its
role in P1-directed restriction. *Virology* 42, 359-367.
- 82.- Galanti, N. and Baserga, R. (1971). Glycolipid
synthesis in the early prereplicative phase of
isoproterenol- stimulated salivary glands of mice. *J.*
Biol. Chem. 246, 6814-6821.
- 83.- Farrance, I.K. and Ivarie, R. (1985). Ethylation of poly
(dC-dG)-poly (dC-dG) by ethyl methanesulfonate
stimulates the activity of mammalian DNA
methyltransferase "in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
82, 1045-1049.

- 84.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).
Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring
Harbor Laboratory, pp 150-161.
- 85.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).
Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring
Harbor Laboratory pp, 383-386.
- 86.- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Macina, R.A., Reyes,
M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L.,
Pettersson, U. and Frasch, A.C.C. (1988). Multiple
Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly
repeated amino acid sequence motifs. Molec. Biochem.
Parasitol. 30, 27-34.
- 87.- Snedecor, G. y Cochran, W. (1981).. Métodos
estadísticos. (Compañía Editorial continental S.A.
México) pp 123-138.
- 88.- Kiernan, J. (1981). Methods for nucleic acids. In "
Histological and histochemical methods (Theory and
Practice) ". Cap. 9. (Maxwell, R. ed.). Pergamon Press.

- 89.- Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, X., Sedat, J. and Razin, A. (1982). The absence of detectable methylated bases in Drosophila melanogaster DNA. FEBS Letters 146, 148-152.
- 90.- Achwal, C.W., Ganguly, P. and Chandra, H.S. (1984). Estimation of the amount of 5-methylcytosine in Drosophila melanogaster DNA by amplified ELISA and photoacoustic spectroscopy. EMBO J. 3, 263-266.
- 91.- Hattman, S., Kenny, C., Berger, L. and Pratt, K. (1978). Comparative study of DNA methylation in three unicellular eukaryotes. J. Bacteriol. 135, 1156-1157.
- 92.- Cummings, D.J., Tait, A. and Goddard, J.M. (1974). Methylated bases in DNA from Paramecium aurelia. Biochim. Biophys. Acta 374, 1-11.
- 93.- Van der Ploeg, L. and Flavell, R. (1980). DNA methylation in the human globin locus in erithroid and nonerithroid tissues. Cell 19, 945-958.
- 94.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory pp 97.

- 95.- Chang, A., Lansman, R., Clayton, D. and Cohen, S. (1975). Studies of mouse mitochondrial DNA in Escherichia coli : structure and function of eucaryotic and procaryotic chimeric plasmid. Cell 6, 231-244.
- 96.- Borrello, M. Pierotti, M. Donghi, R., Bongarzone, I., Mondellini, P. and Della Porta, G. (1986). In vitro methylation of the human Ha-ras oncogene (T 24) affects its transforming activity on NIH/3T3 cells. Cell Biol. Int. Reports 10, 175.
- 97.- Piva, R., Barbieri, R., Del Senno, L., Biagini, R., Buzzoni, D. and Gambari, R. (1986). Differential methylation of the immunoglobulin genes and C-ABL oncogene in human leukemia K 562 cells. Cell Biol. Int. Reports 10, 178.
- 98.- Cihák, A. and Broucek, J. (1972). Dual effect of 5-azacytidine on the synthesis of liver ribonucleic acids. Biochem. Pharmacol. 21, 2497-2507.
- 99.- Lee, T.T. and Karon, M.R. (1976). Inhibition of protein synthesis in 5-azacytidine-treated HeLa cells. Biochem. Pharmacol. 25, 1737-1742.

100.- Munro, H. (1966). The determination of nucleic acids.
In "Methods of biochemical analysis " Vol 14.
(Glick, D. and Wiley, J. eds). pp 131-132.

PUBLICACIONES

Rojas, M.V. and Galanti, N. (1990). DNA methylation in Trypanosoma cruzi. FEBS Letters 263, 113-116.

Rojas, M.V. and Galanti, N. (1991). Relationship between DNA methylation and cell proliferation in Trypanosoma cruzi. FEBS Letters 295, 31-34.