

UCH-FC  
Biotecnología  
073  
C1



FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

## **DNA Glicosilasa NTH1 en la Vía de Reparación del DNA de *Trypanosoma cruzi***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Fernando José Ormeño Ungemach**

Director del Seminario de Título:

Prof. Norbel Galanti Garrone

Patrocinante del Seminario de Título:

Dr. Juan Fernández Hidalgo

Noviembre - 2014

Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

**FERNANDO JOSÉ ORMEÑO UNGEMACH**

**“DNA Glicosilasa NTH1 en la Vía de Reparación del DNA de *Trypanosoma cruzi*”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Norbel Galanti Garrone  
**Director Seminario de Título**

Dr. Juan Fernández Hidalgo  
**Profesor Patrocinante Seminario de Título**

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Ricardo Cabrera Paucar  
**Presidente**

Dra. Daniela Sauma Mahaluf  
**Evaluadora**

Santiago, noviembre de 2014

Este bloque contiene las firmas manuscritas de los miembros de la Comisión Revisora y Evaluadora, escritas en tinta azul sobre líneas horizontales. En el centro de estas firmas se encuentra un sello circular que dice "FACULTAD DE CIENCIAS BIBLIOTECA CENTRAL U. DE CHILE".

## Biografía



El año 2008 entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología en la Universidad de Chile. El verano del 2013 comencé a trabajar en el laboratorio del Profesor Norbel Galanti y a mediados del año 2014 finalicé mi trabajo de Seminario de Título, el cual presento a continuación.

## **Dedicatoria**

*A todos los animales sacrificados para la realización de este trabajo.*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al equipo del laboratorio de Biología Celular y Molecular, por el aprendizaje, la ayuda y el compañerismo entregado durante todo este tiempo. En especial al Profesor Norbel Galanti por sus consejos en torno a mis experimentos.

A mis compañeros de carrera y a las personas que conocí en Chile que se convirtieron en mis amigos, por su compañía, el apoyo y los buenos momentos que pasamos en la Universidad.

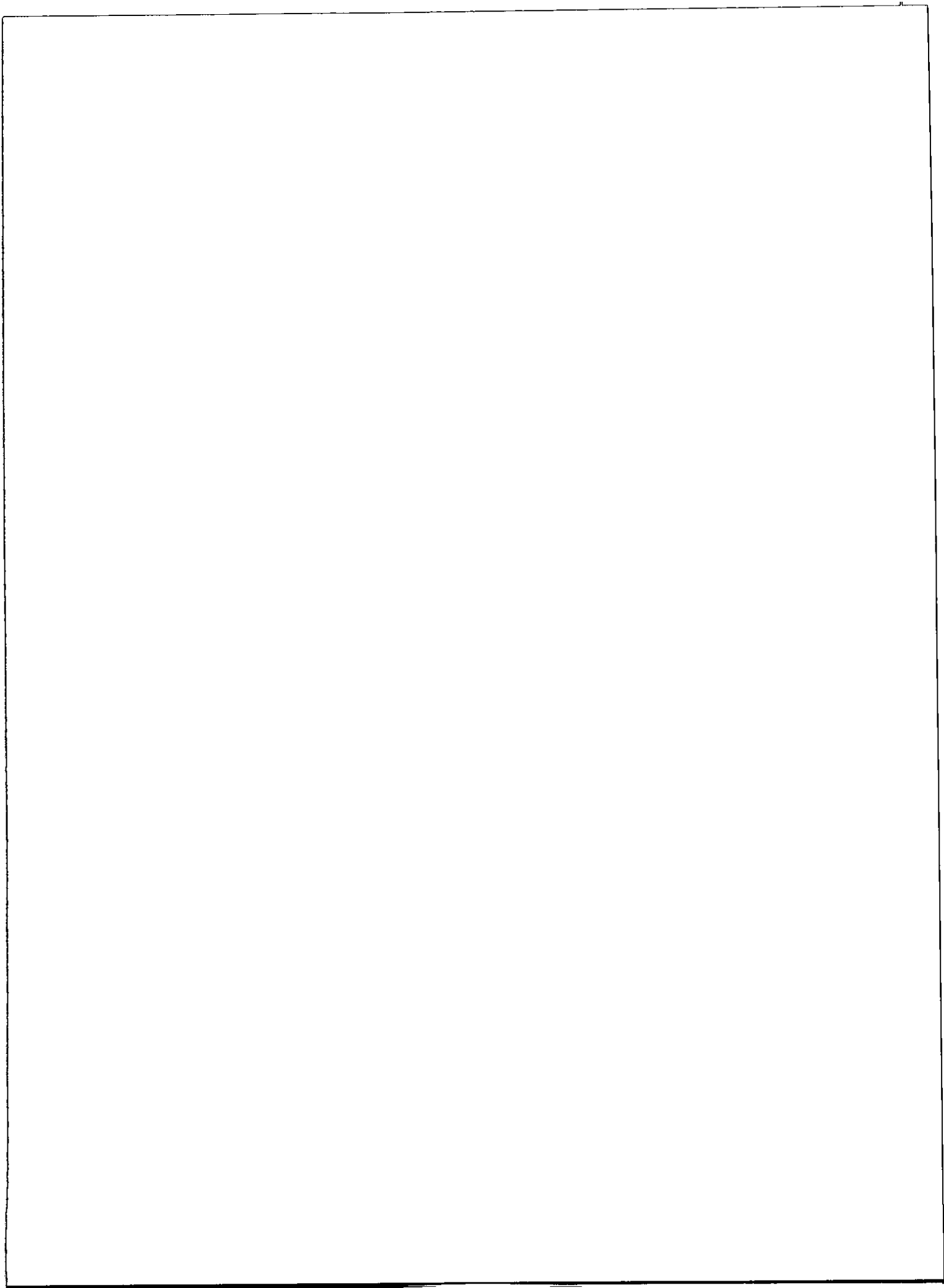
A mis amigos del colegio, quienes han estado conmigo siempre desde que los conocí y han llegado a ser personas que constituyen una parte importante de mi vida.

A mi polola, por ser alguien que me ha acompañado en momentos felices y también en otros difíciles. Gracias por la ayuda entregada durante estos años.

Gracias a todos.

# Índice de Contenidos

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas _____	5
1.2. Etiología de la Enfermedad de Chagas _____	6
1.3. Ciclo de Vida del <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	9
1.4. Cuadro Clínico, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas __	11
1.5. Mecanismos Patofisiológicos y Estrés Oxidativo en <i>Trypanosoma cruzi</i> __	14
1.6. Reparación del DNA _____	17
1.7. DNA glicosilasas _____	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
2.1. Objetivo General _____	24
2.2. Objetivos Específicos _____	24
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1. Tampones, Soluciones y Geles _____	25
3.2. Amplificación y purificación del gen <i>tenth1</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	27
3.3. Ligación del producto de PCR en el vector pQE-80L _____	28
3.4. Selección de colonias transformadas _____	29
3.5. Transformación de <i>E. coli</i> BL21 con la construcción pQE-80L- <i>tenth1</i> e inducción de la expresión de TcNTH1 _____	30
3.6. Purificación parcial de TcNTH1 recombinante en condiciones denaturantes _____	31



3.7. Inmunización de ratones _____	32
3.8. Evaluación y titulación de anticuerpos policlonales _____	33
3.9. Identificación de la enzima TcNTH1 en las diferentes formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	34
3.10. Purificación parcial de TcNTH1 recombinante en condiciones nativas ____	35
3.11. Ensayo de actividad de la enzima TcNTH1 _____	35
3.12. Análisis Bioinformático _____	36
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1. Amplificación y clonamiento del gen codificante para la DNA glicosilasa NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c _____	38
4.2. Análisis bioinformático de la secuencia génica y aminoacídica de la DNA glicosilasa NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	42
4.3. Expresión de TcNTH1 recombinante en bacteria _____	47
4.4. Purificación parcial de la proteína TcNTH1 recombinante _____	50
4.5. Generación de anticuerpos policlonales anti-TcNTH1 _____	56
4.6. Identificación de la enzima TcNTH1 en epimastigote, tripomastigote y amastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c _____	61
4.7. Ensayo de actividad enzimática de TcNTH1 _____	62
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
5.1. Identificación de la expresión de NTH1 en <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c ____	66
5.2. Actividad enzimática de NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c _____	68
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>75</b>



## Índice de Tablas

1. Genes de <i>Trypanosoma cruzi</i> involucrados en la vía BER _____	21
2. Partidores empleados para la amplificación del gen <i>tcnth1</i> _____	27
3. Esquema de inmunización de ratones _____	33
4. Sondas con bases modificadas utilizadas en el ensayo de actividad _____	36

## Índice de Figuras

1. Representación esquemática de las diferentes formas celulares en <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	7
2. Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	10
3. Estructura química de las drogas utilizadas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas _____	13
4. Vía de Reparación por Escisión de Bases (BER) _____	19
5. Modelo de estructura tridimensional de la Endonucleasa III de <i>E. coli</i> _____	23
6. Vector de expresión en bacteria pQE-80L _____	29
7. Amplificación del gen codificante de la DNA glicosilasa NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	38
8. Construcción pQE-80L- <i>tcnth1</i> _____	39
9. Selección de clones de <i>E. coli</i> JM109 transformados con la construcción pQE-80L- <i>tcnth1</i> _____	40
10. Amplificación de <i>tcnth1</i> y digestión de la construcción pQE-80L- <i>tcnth1</i> _____	41
11. Alineamiento de la secuencia nucleotídica codificante para NTH1 de <i>T. cruzi</i> Dm28c con el producto de secuenciación automática de la construcción pQE-80L- <i>tcnth1</i> _____	43

12. Alineamiento de la proteína NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> con la secuencia aminoacídica de NTH1 de <i>Homo sapiens</i> y <i>Bacillus stearothermophilus</i> _____	45
13. Comparación de los modelos tridimensionales de NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> y NTH1 de <i>Homo sapiens</i> _____	46
14. Comparación de residuos aminoacídicos que participan en la catálisis y en la unión a ligandos en los modelos de NTH1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Homo sapiens</i> _____	47
15. Inducción de la expresión de la proteína TcNTH1 en <i>Escherichia coli</i> BL21 transformadas con la construcción pQE-80L- <i>tcnth1</i> _____	49
16. Identificación de la proteína TcNTH1 recombinante purificada parcialmente en condiciones denaturantes _____	51
17. Identificación de la proteína TcNTH1 recombinante purificada parcialmente en condiciones nativas _____	52
18. Evaluación de la expresión de TcNTH1 recombinante en <i>E. coli</i> BL21 _____	54
19. Identificación de TcNTH1 recombinante mediante MALDI-TOF _____	55
20. Evaluación de antiseros sanguíneos sobre lisados de bacteria _____	56
21. Evaluación de anticuerpos policlonales presentes en líquido ascítico sobre lisados de bacteria _____	58
22. Titulación de anticuerpos presentes en líquido ascítico sobre lisados de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c _____	60
23. Detección de la proteína TcNTH1 en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c _____	62
24. Evaluación de la bifuncionalidad de la enzima TcNTH1 sobre la sonda timina glicol _____	63
25. Detección de actividad catalítica de la enzima TcNTH1 sobre una sonda AP (sitio abásico) _____	64
26. Mecanismo enzimático de la proteína NTH1 _____	70

## Lista de Abreviaturas

- [4Fe-4S]<sup>2+</sup>** clúster de hierro-azufre
- 6xHis tag** de seis histidinas
- AP** Apurínico/Apirimídico
- BER** vía de Reparación por Escisión de Bases
- BSA** Albúmina de Suero Bovino
- BsNTH1** NTH1 de *Bacillus stearothermophilus*
- cAMP** Adenosín Monofosfato cíclico
- C-terminal** Extremo carboxilo terminal de un péptido o proteína
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- dRP** Extremo 5'-fosfato desoxirribosa
- ELISA** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- Endo III** Endonucleasa III de *Escherichia coli*
- Exo III** Exonucleasa III de *Escherichia coli*
- FEN1 flap** Endonucleasa 1
- HAI** Ensayo Hemaglutinación
- H2TH** Familia de DNA glicosilasas hélice-dos giros-hélice
- HhH-GDP** Familia de DNA glicosilasas Hélice-horquilla-Hélice
- HRP** Peroxidasa de Rábano Picante
- HsNTH1** NTH1 de *Homo sapiens*
- IFI** Inmunofluorescencia Indirecta
- IgG** Inmunoglobulina G
- IPTG** Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
- Lig1** DNA Ligasa 1
- MALDI-TOF** Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz

**mRNA** RNA mensajero  
**mtDNA** DNA mitocondrial  
**N-terminal** Extremo amino terminal de un péptido o proteína  
**NTH1** Endonucleasa tres homólogo 1 DNA glicosilasa  
**PCNA** Antígeno Nuclear de Células en Proliferación  
**PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa  
**Pol $\beta$**  DNA polimerasa  $\beta$   
**Pol $\delta$**  DNA polimerasa  $\delta$   
**Pol $\epsilon$**  DNA polimerasa  $\epsilon$   
**RNA** Ácido ribonucleico  
**RNS** Especies Reactivas de Nitrógeno  
**ROS** Especies Reactivas de Oxígeno  
**SDS-PAGE** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico  
**TcAPI** AP endonucleasa 1 *Trypanosoma cruzi*  
**TcNTH1** NTH1 de *Trypanosoma cruzi*  
**Tg** Timina glicol  
**UDG** Uracil DNA glicosilasa  
**Ura** Uracilo  
**UV** Ultravioleta

## RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es una patología endémica del continente americano que constituye un grave problema de salud pública. El agente etiológico de esta enfermedad es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual es transmitido a humanos por insectos Triatomíneos. El proceso de infección, después de una fase aguda usualmente asintomática, pasa a una fase crónica que, en aproximadamente un 30% de los casos, deriva en patologías cardíacas y/o digestivas. La fase crónica se establece una vez que este microorganismo logra superar un conjunto de respuestas de defensa producidas por el hospedero. Actualmente no existen medicamentos efectivos para combatir esta enfermedad en estados avanzados de infección, lo que hace imprescindible encontrar o diseñar drogas que actúen contra *T. cruzi* en esa etapa. Existen evidencias de que el parásito es capaz de resistir el estrés oxidativo en diferentes etapas de su ciclo de vida, lo cual sugiere una alta eficiencia de su maquinaria de reparación del DNA. El sistema de Reparación por Escisión de Bases (BER) es uno de los principales mecanismos de reparación del DNA en eucariotes. Las DNA glicosilasas son enzimas involucradas en el reconocimiento del daño oxidativo en el DNA y en la eliminación de bases dañadas, constituyendo el primer paso de la vía BER. Entre las DNA glicosilasas que se han investigado, la proteína NTH1 se ha descrito como una enzima bifuncional que reconoce y elimina principalmente derivados oxidados pirimídicos, para luego catalizar la ruptura de la hebra de DNA mediante

actividad AP liasa. En el genoma de *T. cruzi* se encuentra una secuencia ortóloga de esta enzima, que hemos denominado *tcnth1*. Hasta el momento, no se han publicado estudios que describan su participación en la respuesta frente a estrés oxidativo en *T. cruzi*.

El objetivo de este Seminario de Título fue estudiar la expresión y actividad catalítica de la enzima NTH1 en *Trypanosoma cruzi*. Para ello, el gen *nth1* de *T. cruzi* fue clonado en el vector pQE-80L y expresado en la bacteria *Escherichia coli*. De esta manera, se purificó parcialmente la proteína TcNTH1 recombinante por medio de cromatografía de afinidad en condiciones denaturantes y nativas. La proteína denaturada purificada se utilizó para inmunizar ratones, con la finalidad de generar anticuerpos policlonales. Con los anticuerpos obtenidos, se identificó la expresión de la enzima TcNTH1 en las tres formas celulares de *T. cruzi*, mediante ensayo de Western Blot. Por otra parte, con la enzima purificada parcialmente de forma nativa, se realizaron ensayos de actividad enzimática, usando como sustrato sondas de oligonucleótidos marcados con radiactividad que presentaban una base oxidada (timina glicol) o un sitio apurino/apirimídico (sitio AP). Los resultados obtenidos por estos ensayos mostraron que la enzima TcNTH1 no elimina la base timina glicol, pero sí cataliza la escisión de la sonda que presenta el sitio AP.

El estudio presentado en este Seminario de Título constituye uno de los primeros acercamientos en la investigación de la expresión y funcionalidad de la enzima NTH1 en *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

Chagas disease is an endemic pathology in the American continent, being a serious public health problem. The etiologic agent of this disease is the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), which is transmitted to humans by Triatomine bugs. The infection process, after an acute phase usually asymptomatic, leads to a chronic phase which, in around 30% of the cases, results in cardiac and/or digestive pathologies. The chronic phase is established once the organism can overcome a set of defense responses produced by the host. Currently, there are no effective drugs to treat this disease in the chronic phase. Therefore, it is imperative to find or design drugs that act against *T. cruzi* at that stage. There are evidences that the parasite is able to resist oxidative stress at different stages of its life cycle, suggesting a high efficiency of the DNA repair machinery. The Base Excision Repair System (BER) is one of the main DNA repair mechanisms in eukaryotes. DNA glycosylases are enzymes involved in the recognition of oxidative DNA damage and the removal of damaged bases, constituting the first step of the BER pathway. Among the DNA glycosylases that have been studied, the NTH1 protein has been described as a bifunctional enzyme that recognizes and removes pyrimidine oxidized derivatives, and then catalyze the rupture of the DNA strand through an AP lyase activity. In the *T. cruzi* genome, a sequence orthologous of this enzyme is found, that we have designated as *tcnth1*. To date, no studies have been published describing its involvement in the response to oxidative stress in *T. cruzi*.

The goal of this Seminar Degree was to study the expression and catalytic activity of the NTH1 enzyme in *Trypanosoma cruzi*. For this purpose, the *T. cruzi* gene *nth1* was cloned into the pQE-80L vector and expressed in *Escherichia coli*. Afterwards, the TcNTH1 recombinant protein was partially purified by affinity chromatography on denaturing and native conditions. The denatured purified protein was used to immunize mice with the purpose of generating polyclonal antibodies. With those antibodies, the expression of the TcNTH1 enzyme was identified in the three cellular forms of *T. cruzi*, through Western Blot assay. With the partially purified native enzyme, enzyme activity assays were performed, using labeled oligonucleotide probes presenting an oxidized base (thymine glycol) or an apurinic/apyrimidinic site (AP site), as substrates. Results from these assays showed that the TcNTH1 enzyme does not remove the thymine glycol base, but catalyzes the cleavage of the probe showing an AP site.

The study presented in this Seminar Degree represents one of the first approaches in the investigation of the expression and function of the NTH1 enzyme in *Trypanosoma cruzi*.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, descrita por primera vez a comienzos del siglo XX por el médico brasileño Carlos Chagas (Chagas, 1909), es una parasitosis endémica de Latinoamérica causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Rassi y col., 2010). Según la Organización Mundial de la Salud, la Enfermedad de Chagas es una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas en el mundo, estimándose que existen sobre 7 a 8 millones de personas infectadas y aproximadamente 100 millones de personas en riesgo de contraer la infección (WHO, 2010; WHO, 2012). En consecuencia, constituye un grave problema social, económico y de salud pública que afecta principalmente a los países subdesarrollados (Rassi y col., 2010). En Chile, el área históricamente endémica se extiende desde la región de Arica y Parinacota hasta la región del Libertador Bernardo O'Higgins (MINSAL, 2012). Según los datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud (ENS), la infección por *T. cruzi* afecta al 0,7% de la población chilena (98.000 personas incluyendo a niños de menos de 1 año), con una prevalencia de 1,5% en zonas rurales y de 0,6% en zonas urbanas (MINSAL, 2012).

El agente infeccioso de la Enfermedad de Chagas es transmitido a seres humanos por las deyecciones realizadas durante la picadura de insectos del orden Hemíptero, de la subfamilia de los Triatominos, conocidos popularmente en Chile como "vinchuca". Estos insectos no solamente se alimentan de la sangre de humanos, sino que también de otros mamíferos que pasan a constituir un amplio reservorio del parásito, tales como

perros, gatos y roedores domésticos (Rassi y col., 2010). Todas las especies de Triatomíneos son consideradas capaces de transmitir el parásito, pero las cinco especies que se reconocen como los vectores más importantes de la Enfermedad de Chagas son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* (Gourbière y col., 2012). En Chile el principal vector intradomiciliario es *Triatoma infestans*, siendo otras especies del género *Mepraia* de hábitos mayoritariamente silvestres (MINSAL, 2012).

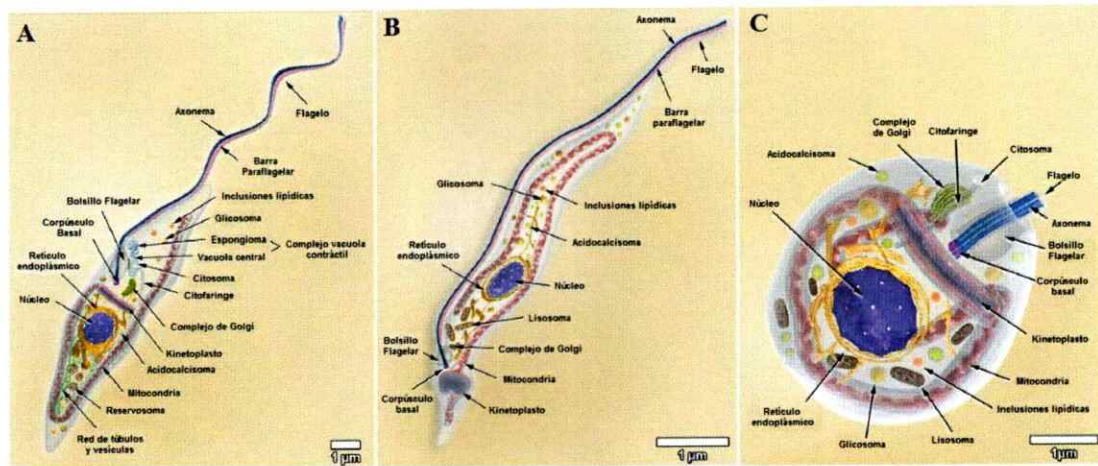
Otras formas de transmisión son por transfusión de sangre, transplante de órganos, transferencia transplacentaria de la madre al feto, ingestión de alimentos contaminados o por accidentes de laboratorio (Rassi y col., 2010; MINSAL, 2012). En los últimos años, los movimientos migratorios han hecho que la enfermedad sea detectada en regiones no endémicas del planeta, como Estados Unidos, Canadá, Australia, Europa y Japón (Lescure y col., 2010; Rassi y col., 2010).

## 1.2. Etiología de la Enfermedad de Chagas

*Trypanosoma cruzi* se clasifica como un protozoo parásito perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae, en la cual se incluyen otras especies que también representan agentes infecciosos severos para la población humana, como *Trypanosoma brucei*, causante de la Tripanosomiasis Africana o Enfermedad del Sueño, y *Leishmania spp.*, causante de Leishmaniasis (De Souza, 2002; Daniels y col., 2010).

En el ciclo biológico de este organismo se encuentran básicamente tres formas celulares (Figura 1): a) *Epimastigotes*, forma extracelular que prolifera en el intestino

del Triatomino; b) *Tripomastigotes*, forma infectiva no proliferativa encontrada en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de Triatominos, y c) *Amastigotes*, forma intracelular y replicativa presente el interior de células de mamíferos (Tyler & Engman, 2001).



**Figura 1: Representación esquemática de las diferentes formas celulares en *Trypanosoma cruzi*.** A: Epimastigote, B: Tripomastigote, C: Amastigote. Las imágenes fueron obtenidas en base a micrografías de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido y transmisión (Imagen modificada de Texeira y col., 2012).

Los Tripanosomátidos poseen una serie de particularidades que los diferencian notablemente del resto de los organismos eucariontes. Durante su proceso de división celular, las fibras de cromatina no forman cromosomas visibles, no se observa presencia de los polos del huso mitótico y la envoltura nuclear persiste durante todo el proceso (Spadiliero y col., 2002). El comportamiento inusual de su cromatina se ha explicado en parte por las diferencias bioquímicas existentes entre las histonas de los Tripanosomátidos y las de otros eucariotas recientes (Toro & Galanti, 1990). Se ha descrito que las histonas de *T. cruzi* presentan un dominio globular flanqueado por

dominios N-terminal y C-terminal divergentes, a diferencia de los eucariontes recientes, que presentan histonas altamente conservadas (Galanti y col., 1998, Elías y col., 2009).

Por otra parte, en la inmensa mayoría de los eucariotas los genes codificadores de proteínas se transcriben en mRNA monocistrónicos que contienen exones (secuencias codificantes) e intrones (principalmente secuencias no codificantes) que se procesan y forman el mRNA maduros a través *cis-splicing*. Sin embargo, en los Tripanosomátidos la transcripción es policistrónica, no hay intrones y, por lo tanto, no hay reacciones de corte y empalme en *cis*. El procesamiento del mRNA inmaduro en unidades individuales funcionales, se efectúa mediante reacciones de *trans-splicing* (Texeira, 1998). Se ha encontrado que este proceso opera sólo en trypanosomátidos, *Euglena* y gusanos nemátodos y tremátodos (Donelson & Zeng, 1990).

Mientras que en la gran mayoría de eucariotas, la RNA polimerasa II es la enzima responsable de la transcripción de genes que codifican para proteínas y la RNA polimerasa I transcribe el RNA ribosomal, en Tripanosomátidos la transcripción de genes codificadores de proteínas se puede realizar por la RNA polimerasa I o un enzima con propiedades similares (Texeira & daRocha, 2003).

Probablemente su característica morfológica más distintiva es la presencia de una única y gran mitocondria, con una estructura (kinetoplasto) que posee entre el 15 y 30% del genoma del organismo (de Souza y col., 2009). El RNA transcrito en la mitocondria es procesado a través de modificaciones postraduccionales, en un proceso denominado edición del RNA. No obstante, la edición de RNA en mitocondrias es distinta de otros tipos de procesamiento del RNA (Stuart, 1991).

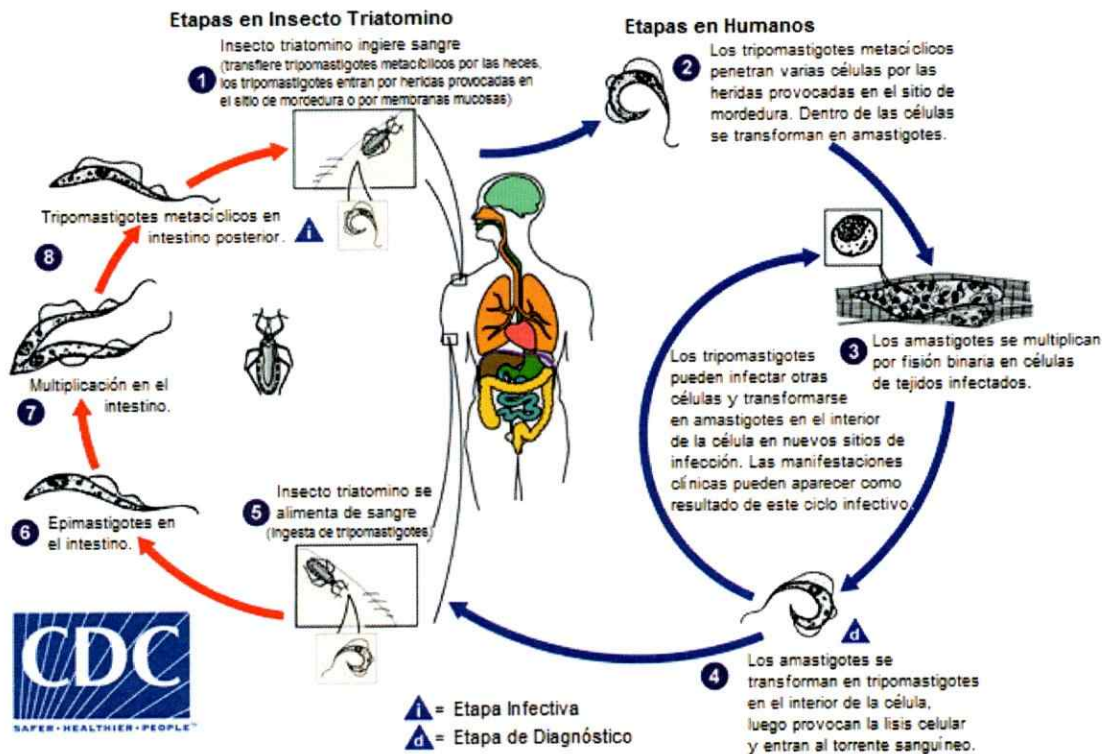
Todas estas características distintivas de los Tripanosomátidos hacen que su estudio y manejo en condiciones de laboratorio sea más complejo en comparación a otros eucariontes unicelulares, en donde los protocolos de investigación y manipulación están bastante estandarizados.

### **1.3. Ciclo de Vida del *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida complejo e indirecto, con varias etapas de desarrollo en el organismo vector y en el hospedero (Figura 2). La transmisión del parásito ocurre en el momento en que un insecto hematófago Triatomino se alimenta de la sangre de algún mamífero (Rassi y col., 2010). Durante la succión de la sangre a través de la probóscide (estructura bucal), el insecto simultáneamente deposita sus deyecciones (Amino y col, 2002), las que contienen tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva no replicativa del parásito (deSouza, 2002; Rassi y col., 2010).

Las heces del insecto son introducidas al organismo del mamífero por medio de la erosión provocada por el rascado, inducido por el prurito que genera la picadura del vector, o través de mucosas permisivas o membranas conjuntivas (Amino y col, 2002; Rassi y col., 2010). Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de infectar un amplio rango de células nucleadas de mamífero. La invasión se produce por un mecanismo en donde los microtúbulos del citoesqueleto de la célula de mamífero son dirigidos a los lisosomas para reclutarlos en el punto de unión del parásito con la membrana celular (Tardieux y col., 1992). Estos lisosomas se fusionan con la membrana plasmática,

formando, en primer lugar, una unión con los parásitos y luego un compartimento vacuolar que permite la entrada del parásito (Rodríguez y col., 1997).



**Figura 2:** Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*. (Imagen modificada de [cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/](http://cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/)).

En la vesícula parasitófora resultante, la acidificación del ambiente estimula la secreción de una molécula porina-like en el patógeno, Tc-Tox la cual facilita la salida del microorganismo de la vesícula (Andrews, 1993). Los tripomastigotes metacíclicos entonces se escapan de la vacuola y se diferencian a la forma amastigote, los que proliferan mediante fisión binaria en el citoplasma de la célula infectada para formar un pseudoquiste (deSouza, 2002), dentro del cual se transforman en tripomastigotes móviles (Andrews, 1993). Una vez formados, los tripomastigotes escapan del pseudoquiste hacia la sangre y la linfa, provocando la lisis de las células infectadas e

invadiendo otras células del organismo de manera esencialmente similar a la invasión metacíclica (Tyler & Engman, 2001). De esta manera, *T. cruzi* puede infectar las otras células del organismo y permanecer durante largo tiempo formando nidos de amastigotes en diversos órganos del cuerpo (Tyler & Engman, 2001).

El ciclo biológico continúa si eventualmente un insecto Triatomino se alimenta de este mamífero infectado, ingiriendo de esta manera los tripomastigotes presentes en su sangre. En el estómago del insecto la mayor parte de los tripomastigotes se transforman en epimastigotes (deSouza, 2002). Luego en el intestino, los epimastigotes se dividen repetidamente por un proceso de fisión binaria y pueden adherirse a las células intestinales por hemidesmosomas (deSouza, 2002). El proceso de metaciclogénesis puede ser desencadenada por la interacción hidrófoba entre el flagelo de los epimastigotes y el sustrato al cual se adhieren, siendo un mecanismo mediado por cAMP (Gonzales-Perdomo y col., 1988). Una vez formados, los tripomastigotes metacíclicos se desprenden de la pared del intestino y son excretados por el insecto, completando el ciclo (Tyler & Engman, 2001).

#### **1.4. Cuadro Clínico, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas**

La Enfermedad de Chagas presenta tres etapas bien definidas:

- Etapas aguda: Se inicia al momento de adquirir la infección por cualquiera de sus vías y dura entre 2 y 4 meses. Generalmente es asintomática y más frecuente en personas jóvenes. Los pacientes sintomáticos presentan mayoritariamente signos agudos de la

enfermedad: fiebre, signos de puerta de entrada (chagoma), edema, adenopatías satelitales, hepatomegalia (40% de los casos) y esplenomegalia.

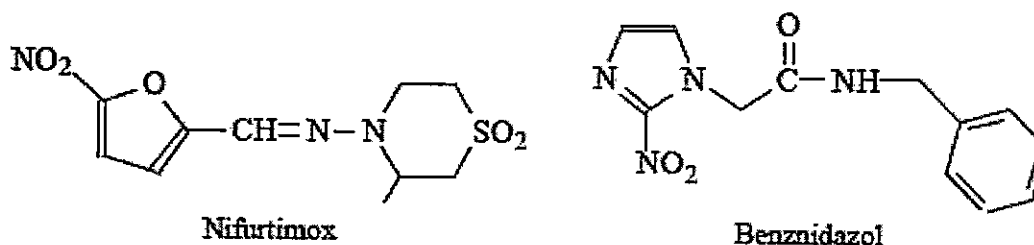
- Etapa crónica indeterminada (asintomática): Comienza cuando la parasitemia pasa a ser indetectable, representando al 50-70% de los casos y se caracteriza por ausencia de síntomas.

- Etapa crónica determinada (sintomática): Alrededor de un tercio de los pacientes chagásicos desarrollará síntomas clínicos tales como cardiopatías, megacolon o megaesófago y neurodegeneración después de 10 a 30 años de la infección (Texeira, 2006; Rassi y col; 2010; MINSAL, 2012).

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se realiza por métodos directos o indirectos, dependiendo de la fase clínica. Los métodos directos (observación microscópica directa, gota gruesa, *microstrout*, xenodiagnóstico, PCR) se basan en la observación directa del parásito o la detección de su material genético y se utilizan principalmente en la etapa aguda, pacientes inmunodeprimidos y menores de 9 meses. Por otro lado, los métodos indirectos (HAI, ELISA, IFI, *western blot*) se basan en la detección de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* (IgG anti-*T. cruzi*), utilizados principalmente en la etapa crónica, ya sea sintomática o asintomática (Lescure y col., 2010; Rassi y col., 2010; MINSAL; 2012). En Chile, todas las muestras que resulten positivas por métodos indirectos en los distintos establecimientos de salud o laboratorios públicos y privados, deben ser enviadas al Laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública o a los centros reconocidos por éste para la confirmación del diagnóstico (MINSAL; 2012).



Actualmente, se emplean dos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad, los cuales fueron desarrollados hace más de 30 años. Se trata de Nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamina)tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) y Benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida) (Figura 3), siendo el primero el único disponible en Chile (MINSAL; 2012). Se ha propuesto que el mecanismo de acción del Nifurtimox involucra la reducción del grupo nitro, generando radicales nitroanión. Éstos en presencia de oxígeno, conducen a la formación de intermediarios reactivos, como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Por su parte, el Benznidazol actúa produciendo intermediarios nitro-reducidos que se unen al DNA, proteínas y lípidos, inhibiendo la síntesis de proteínas y la cadena respiratoria (Maya y col., 1997; Coura & de Castro, 2002; Apt & Zulantay, 2011). El uso de cualquiera de estos medicamentos se acompaña de severas alteraciones digestivas, hematológicas, dermatológicas y neurológicas en el paciente (Apt & Zulantay, 2011). Además, su actividad antiparasitaria es generalmente ineficaz en la fase crónica (Maya y col., 1997; Coura & de Castro, 2002; Lescure y col., 2010). Lo anterior hace que sea indispensable desarrollar nuevos y seguros agentes terapéuticos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.



**Figura 3: Estructura química de las drogas utilizadas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.** Nifurtimox es producido por Bayer y Benznidazol el producido por Roche Pharmaceutical (Imagen extraída de Guedes y col., 2006).

### 1.5. Mecanismos Patofisiológicos y Estrés Oxidativo en *Trypanosoma cruzi*

Una vez que los tripomastigotes metacíclicos ingresan al hospedero, pueden invadir diferentes tipos de células incluyendo macrófagos, células del músculo liso y estriado y fibroblastos (Piacenza y col., 2009). Los principales factores de virulencia del parásito son mucinas y *trans*-sialidasas de la superficie, que participan en la adhesión a las células hospedero, la invasión y la evasión inmune (Lescure y col., 2010). Los resultados de varios estudios en modelos experimentales de infección por *T. cruzi*, han sugerido que durante la fase aguda de la Enfermedad de Chagas, las mucinas y el ADN de parásitos son reconocidos por los receptores tipo Toll TLR2 y TLR9 (Lescure y col., 2010). Éstos desencadena una fuerte respuesta inmune, la que es llevada a cabo por Linfocitos T-colaboradores 1 (T<sub>h</sub>1) junto a células CD8, y se caracteriza por la producción de algunas citoquinas proinflamatorias, tales como interferón  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina 12 (IL-12) (Rassi y col., 2010).

Por otra parte, después del reconocimiento del parásito y de la fagocitosis, se desencadena el estallido oxidativo en macrófagos. Durante el proceso de fagocitosis, el complejo NADPH oxidasa (NADPHox) es activado en macrófagos, asociándose a la membrana de la vesícula parasitófora. Como resultado, grandes cantidades del radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) son dirigidas contra el parásito internalizado (Piacenza y col., 2013). El radical superóxido puede dismutar espontáneamente o enzimáticamente por la acción de la superóxido dismutasa (SOD), dando lugar a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es un agente oxidante con mayor capacidad difusional (Piacenza y col., 2009). También

los iones metálicos de transición en presencia de  $H_2O_2$  generan radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ), un oxidante altamente reactivo (Piacenza y col., 2009).

La estimulación de los macrófagos con citoquinas proinflamatorias, conduce a la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) con la generación de grandes cantidades de óxido nítrico ( $\bullet NO$ ). El óxido nítrico, un radical hidrófobo que se produce en el citoplasma, difunde a la vesícula parasitófora donde reacciona con el radical superóxido, produciendo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). El peroxinitrito es un potente e inestable agente oxidante que deriva en especies secundarias como  $\bullet OH$ , dióxido de nitrógeno ( $\bullet NO_2$ ) y carbonato ( $CO_3^{\bullet -}$ ), todos ellos radicales que pueden oxidar lípidos, proteínas y DNA (Piacenza y col., 2009).

El daño en el resto de órganos y tejidos durante la infección aguda de *T. cruzi*, es causada por el parásito en sí y por la respuesta inmunoinflamatoria aguda del hospedero, que está provocada por la presencia de *T. cruzi* (Rassi y col., 2010). En cardiomiocitos infectados por amastigotes, se genera inflamación crónica cardíaca, la cual provoca disfunción mitocondrial de las células cardíacas y estrés oxidativo al interior de las células (Lescure y col., 2010; Piacenza y col., 2013).

Finalmente, debido a la alimentación de los insectos hematófagos, la hemoglobina presente en la sangre de mamíferos es catabolizada en el tracto digestivo de estos artrópodos, donde se ubican los epimastigotes de *T. cruzi*, produciéndose la liberación del grupo prostético Hemo. Por la Reacción de Fenton, el Hierro (II) presente en el grupo Hemo reacciona con  $H_2O_2$ , generándose Hierro (III), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y anión hidróxido ( $OH^-$ ). A su vez, el Hierro (III) descompone el  $H_2O_2$  en  $HOO\bullet$  y  $H^+$ , cambiando su estado de oxidación a Hierro (II). Esto conlleva a un proceso cíclico hasta

agotar el peróxido de hidrógeno en el intestino del insecto (Graca-Souza, 2006). Las especies reactivas formadas en el insecto también atacan las formas epimastigotas del parásito presentes en su estómago.

En resumen, durante todo su ciclo de vida *T. cruzi* se encuentra constantemente enfrentado de manera directa a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) y, a pesar de ello, es capaz de sobrevivir y proliferar en los diferentes lugares que invade. En trabajos realizados en el laboratorio, se observó que el parásito es capaz de reparar el daño en el DNA provocado por  $H_2O_2$  y  $ONOO^-$ . Al realizar los mismos ensayos de resistencia frente a ROS y RNS junto con la droga metoxiamina, inhibidor de una de las enzimas involucradas en reparar el daño oxidativo en el DNA, la viabilidad de *T. cruzi* y su capacidad de reparación del material genético se ve notoriamente disminuida (Cabrera y col., 2011). Adicionalmente, se describió que enzimas involucradas en la reparación del DNA de *T. cruzi* se expresan en las tres formas celulares del parásito y participan en la mantención de su viabilidad cuando es desafiado con  $H_2O_2$  y  $ONOO^-$  (Furtado y col., 2012; Sepúlveda y col., 2014).

Estos datos sugieren que *T. cruzi* presenta resistencia al estrés oxidativo, por lo que el estudio de los mecanismos implicados en la reparación genética de este parásito podría conducir a un mejor entendimiento de los procesos de infección y establecimiento de este microorganismo en seres humanos.

## 1.6. Reparación del DNA

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno provocan alteraciones en la estructura química del DNA, tales como oxidación de bases nitrogenadas, generación de sitiosapurínicos/apirimídicos (AP) y ruptura de una o ambas hebras del DNA; siendo todas estas modificaciones citotóxicas y/o mutagénicas (David y col., 2007; Hazra y col., 2007). La guanina es la base que se ve mayormente afectada por ROS/RNS, debido a su bajo potencial redox, lo cual provoca una gran variedad de derivados oxidados. El producto de oxidación de guanina más estudiado es 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), debido a su uso como marcador del daño oxidativo en el DNA. Esta base alterada es capaz de aparear con adenina, lo cual puede derivar en transversiones G→T (Demple & Harrison, 1994; Marnett, 2000; David y col., 2007). Entre las pirimidinas, la base modificada más estudiada es la 5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimina (Timina glicol o Tg). Aunque esta base aparee principalmente con adenina, como también lo hace la timina en condiciones normales, su presencia genera severas distorsiones en la estructura del DNA e impide la replicación al bloquear la DNA polimerasa (Kao y col., 1993; Demple & Harrison, 1994).

El principal mecanismo de reparación del DNA dañado por estrés oxidativo es la vía de Reparación por Escisión de Bases (BER), el cual es un mecanismo altamente conservado desde las bacterias hasta los seres humanos en términos de los componentes básicos de la maquinaria BER (Hazra y col., 2007; Hitomi y col., 2007). Este mecanismo requiere de al menos cuatro enzimas encargadas de reparar el DNA dañado:

1) DNA glicosilasa, 2) endonucleasaapurínica/apirimidínica (AP), 3) DNA polimerasa y 4) DNA ligasa (Ide & Kotera, 2004; Hazra y col., 2007) (Figura 4).

El mecanismo BER comienza con el reconocimiento del nucleótido dañado por parte de la DNA glicosilasa, la cual cataliza la escisión del enlace N-glucosídico que une la ribosa con la base nitrogenada dañada, creando un sitio AP (Ide & Kotera, 2004; Hitomi y col., 2007; Wilson & Bohr, 2007). La mayoría de las DNA glicosilasas involucradas en la reparación de bases oxidadas también poseen actividad AP liasa (Ide & Kotera, 2004; Sancar y col., 2004), pudiendo catalizar la escisión del enlace 3' fosfodiéster mediante  $\beta$ -eliminación, o de los enlaces 3' y 5' fosfodiéster por medio de  $\beta,\delta$ -eliminación (Ide & Kotera, 2004; Wilson & Bohr, 2007).

En la siguiente etapa, la enzima AP endonucleasa hidroliza el enlace fosfodiéster en el lado 5' del nucleótido abásico, generando un extremo 3'-OH y un terminal 5'-fosfato desoxirribosa (dRP) (Hazra y col., 2007; Wilson & Bohr, 2007). Para el caso de una DNA glicosilasa/AP liasa, la  $\beta$ -eliminación genera un terminal 3' 4-hidroxipental, también denominado 3'- $\alpha,\beta$ -aldehído insaturado, y la  $\beta,\delta$ -eliminación origina un terminal 3' fosfato. Ambos productos bloquean la polimerización y/o ligación, y pueden ser reconocidos y eliminados por la AP endonucleasa (Ide & Kotera, 2004; Hazra y col., 2007; Wilson & Bohr, 2007).

Posteriormente, la DNA polimerasa  $\beta$  (Pol $\beta$ ) llena el espacio generado (*nick*) por la eliminación del nucleótido, según complementariedad de bases. La Pol $\beta$  también presenta actividad dRP liasa, pudiendo eliminar el azúcar remanente en caso de que el mecanismo BER hubiese comenzado con una DNA glicosilasa sin actividad AP liasa. Por último, la DNA ligasa III/XRCC1 cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre



nucleótidos polimerizados son unidos a la hebra de DNA con la Ligasa I (Lig1). La proteína PCNA funciona durante todo el proceso como un andamio del resto de las enzimas. La vía larga se presenta principalmente cuando el sitio AP es resistente a la actividad AP liasa o a la ruptura espontánea (Ide & Kotera, 2004; Sancar y col., 2004).

Si bien muchos aspectos relacionados al estrés oxidativo en *T. cruzi* han sido ampliamente estudiados (Krauth-Siegel y col., 1987; Jockers-Scherubl y col., 1989; Rassi y col., 2010; Flohé, 2012), no existe mayor documentación en torno al funcionamiento del sistema BER en este parásito (Passos-Silva y col., 2010; Genoís y col., 2014). Considerando que las DNA glicosilasas son enzimas cruciales en el sistema BER por ser las enzimas que reconocen el daño oxidativo, dando inicio a la reparación del DNA, y por su participación en la selección de la vía corta o larga del mecanismo BER (Fortini y col., 1999; Fárez-Vidal y col., 2001); su expresión y funcionalidad debe ser estudiada en *T. cruzi*, con el fin de lograr una mejor comprensión del mecanismo de reparación del DNA por la vía BER en el parásito.

### **1.7. DNA glicosilasas**

Las DNA glicosilasas pueden ser de dos tipos: monofuncionales si sólo eliminan una base modificada del DNA (actividad N-glicosilasa) o bifuncionales si eliminan una base modificada y además catalizan la ruptura de la hebra de DNA (actividad N-glicosilasa/AP liasa) (Ide & Kotera, 2004; Hazra y col., 2007; Wilson & Bohr, 2007). La determinación de estructuras tridimensionales de proteínas ha permitido clasificar las DNA glicosilasas del mecanismo BER en tres familias, de acuerdo a un motivo



estructural común: hélice-horquilla-hélice (HhH-GDP), hélice-dos giros-hélice (H2TH) y uracil DNA glicosilasas (UDGs) (Krokan y col., 1997; Fromme y col., 2004; Huffman y col., 2005; Hitomi y col., 2007). Las tres familias de DNA glicosilasas se encuentran muy conservadas en los sistemas vivos, que van desde *E. coli* a mamíferos, y pudieron haber evolucionado independientemente en ellos (Hazra y col., 2007).

En la secuencia genómica de *T. cruzi* de la cepa CL Brener, se identificaron regiones que codificarían para DNA glicosilasas que presentan ortología con respecto a DNA glicosilasas encontradas en humano y *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 1) (Genois y col., 2014). Por otro lado, hasta la fecha sólo se ha estudiado la expresión y función de dos DNA glicosilasas en *T. cruzi*: la Uracil N-glicosilasa (TcUNG), capaz de reparar las lesiones de uracilo en el genoma nuclear de *T. cruzi* (Peña-Díaz y col., 2004), y la 8-oxoguanina DNA glicosilasa 1 (TcOGG1), encargada de reparar principalmente derivados oxidados de purinas (Furtado y col., 2012).

**Tabla 1: Genes de *Trypanosoma cruzi* involucrados en la vía BER**

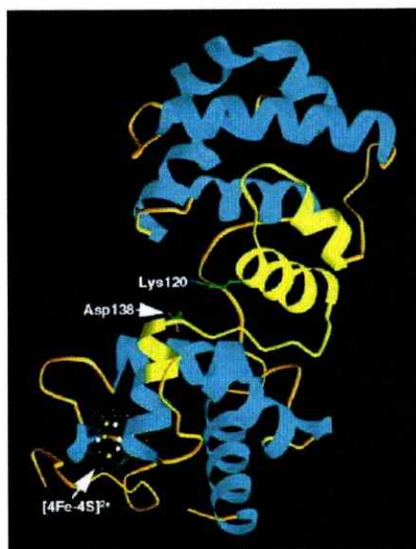
Producto genético	Proteína; Función	NCBI ID Gen		
		Humano	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. cruzi</i>
OGG1	<i>8-Oxo-guanine glycosylase 1</i> ; elimina 8-oxoG apareado con C, T, G	NM_016821	YML060W	Tc00.1047053510229.20
MYH	<i>Mut Y homolog DNA glycosylase</i> ; elimina A apareado con 8-oxoG	NM_012222	-	Tc00.1047053511803.20
NTH1	<i>Endonuclease three homolog 1 DNA glycosylase</i> ; elimina pirimidinas oxidadas, fragmentadas y anillo-saturados	NM_002528	YAL015C	Tc00.1047053504005.10
NEIL3	<i>Nei-like DNA glycosylase 3</i> ; elimina productos oxidados de pirimidinas	NM_018248	YBL019W	Tc00.1047053510347.50

La familia de DNA glicosilasas HhH-GDP presenta un motivo común de hélice-horquilla-hélice, seguido por un bucle rico en glicinas y prolinas con un residuo de ácido aspártico altamente conservado. Además la horquilla presenta una secuencia consenso muy conservada, constituida por L/F-P/K/H-G-V/I-G-K/R/T (Hitomi y col., 2007). La organización general de la familia HhH-GDP presenta dos dominios compuestos por estructuras de  $\alpha$ -hélice en los extremos N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal comúnmente presenta cuatro  $\alpha$ -hélice y el dominio C-terminal seis a siete  $\alpha$ -hélice (Krokan y col., 1997; Huffman y col., 2005; Hitomi y col., 2007).

Entre las enzimas pertenecientes a la familia HhH-GDP están Endo III o NTH1, OGG1, AlkA, MIG y MutY (Dizdaroglu, 2005; Huffman y col., 2005; Hitomi y col., 2007). Las DNA glicosilasas más estudiadas en la reparación de bases oxidadas en eucariontes son las enzimas OGG1 y NTH1 (Hazra y col., 2007). Mientras OGG1 repara derivados de purina, la enzima NTH1 detecta y repara una gran variedad de modificaciones en pirimidinas, tales como *cis*- y *trans*-timina glicol (Tg), 5-hidroxicitosina (hoC), dihidrouracilo (DHU), 5-hidroxiuracilo (hoU), urea y al menos otros diez derivados de pirimidinas, en adición de derivados de formamidopirimidina de guanina (FapyG) y adenina (FapyA), sitios AP, y la estructura de tipo anillo-abierto 1,N<sup>6</sup>-etenoadenina ( $\epsilon$ A) (Demple & Harrison, 1994; Ide & Kotera, 2004; Dizdaroglu, 2005; Hazra y col., 2007).

Dada la importancia de la DNA glicosilasa Endonucleasa III (NTH1), su estudio abarca organismos como *E. coli*, levaduras, plantas, gusanos, ratones y humanos (Hazra y col., 2007), determinándose que esta enzima es bifuncional, al poseer actividad N-glicosilasa/AP liasa mediante  $\beta$ -eliminación (Krokan y col., 1997; Fromme y col., 2004;

Huffman y col., 2005; Hazra y col., 2007; Hitomi y col., 2007). Una particularidad de esta enzima, es la presencia un patrón conservado de 4 Cys de unión a un clúster de hierro-azufre  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , sobre el cual se ha propuesto una función de tipo estructural y estabilizadora en la unión al DNA (Thayer y col., 1995) (Figura 5).



**Figura 5: Modelo de estructura tridimensional de la Endonucleasa III de *E. coli*.** Se destaca en amarillo el motivo HhH-GDP, los residuos catalíticos Lys120 y Asp138 en verde y el cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  en la región C-terminal (Imagen extraída de Krokan y col., 1997)

En el genoma de *T. cruzi* de la cepa Dm28c se encontró una secuencia ortóloga de la DNA glicosilasa NTH1 (Grisard y col., 2014). El estudio de la expresión y funcionalidad de esta enzima en *T. cruzi*, permitiría obtener una primera aproximación a la comprensión del funcionamiento y las características de la DNA glicosilasa NTH1 en el parásito. El trabajo desarrollado en este Seminario de Título formaría parte de un estudio mayor que busca comprender los mecanismos que subyacen en la vía BER en *T. cruzi*, y cómo éstos influirían en la resistencia del parásito a estrés oxidativo. El entendimiento de ello podría conducir a nuevas terapias que permitan enfrentar de mejor manera la Enfermedad de Chagas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Investigar la expresión y funcionalidad de la DNA glicosilasa NTH1 de *Trypanosoma cruzi* (TcNTH1)

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Clonar el gen *tcnth1* en el vector de expresión bacteriana pQE-80L.
2. Purificar parcialmente la proteína recombinante DNA glicosilasa TcNTH1.
3. Inmunizar ratones con la proteína TcNTH1 recombinante y obtener el suero sanguíneo.
4. Evaluar la efectividad de los sueros obtenidos en el reconocimiento de TcNTH1 en *Trypanosoma cruzi*.
5. Evaluar la actividad enzimática de la proteína recombinante TcNTH1 sobre sondas de DNA que presentan nucleótidos modificados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Tampones, Soluciones y Geles

- **Medio de cultivo LB:** 10 g/L Triptona; 5 g/L extracto de Levadura; 10 g/L NaCl pH 7,0.
- **Medio de cultivo LB-amp:** Medio LB suplementado con 12,5 µl/ml de Ampicilina.
- **Medio de cultivo LB-amp agar:** Medio LB-amp con 15 mg/ml de agar.
- **Gel de Agarosa:** 5 ml TBE 5x; 0,8%(p/v) en 25 ml totales
- **Gel Denaturante Acrilamida-Urea:** 7 M Urea; 4 ml TBE 5x; bis-acrilamida 20%(v/v) en 40 ml totales
- **Buffer TBE (5x):** 446 mM Tris pH 8,3; 445 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 12,8 mM EDTA
- **Buffer de restricción E (Promega):** 6 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl; 1 mM DTT
- **Buffer de Ligación 10x (Promega):** 300 mM Tris-HCl pH 7,8; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT; 10 mM ATP
- **Buffer de carga de proteínas:** 125 mM Tris pH 6,8; glicerol 15%(v/v); SDS 2%(p/v); azul de bromofenol 0,05%(p/v); 2-mercaptoetanol 10%(v/v)
- **Buffer de carga de DNA:** 5 mM Tris pH 7,5; formamida 96%(v/v); 20 mM EDTA; xileno cyanol 0,05%(p/v); azul de bromofenol 0,05%(p/v)
- **Buffer de reacción Endo III 1x (New England Biolabs):** 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
- **Buffer PBS:** 8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,15 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2
- **PBS-Tween:** Buffer PBS con detergente Tween-20 0,05%(v/v)
- **Buffer mild stripping:** 15 g/L Glicina, 1 g/L SDS, Tween-20 1%(v/v) pH 2,2

- **Solución de Corrida:** 25 mM Tris pH 8,73; 192 mM Glicina; 3,47 mM SDS
- **Solución de Transferencia:** 25 mM Tris; 192 mM Glicina; Metanol 20%(v/v)
- **Solución de Tinción:** 0,5 g/L azul de *Coomassie*; Ácido Acético 10%(v/v); Etanol 45%(v/v)
- **Solución de Destinción:** Ácido Acético 0,075%(v/v); Etanol 0,05%(v/v)
- **Solución de Bloqueo Leche 5%:** PBS-Tween con Leche *Blotting-Grade Blocker* (Biorad) 5%(p/v)
- **Solución de Bloqueo BSA 5%:** PBS-Tween con BSA (Winkler) 5%(p/v)
- **PBS-T Leche 1%:** PBS-Tween con Leche *Blotting-Grade Blocker* (Biorad) 1%(p/v)
- **PBS-T BSA 1%:** PBS-Tween con BSA (Winkler) 1%(p/v)
- **PBS-T BSA 2%:** PBS-Tween con BSA (Winkler) 2%(p/v)
- **Buffer B:** 6 M GnCl; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-Cl pH 8,0
- **Buffer C:** 8 M Urea; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-Cl pH 6,3
- **Buffer E:** 8 M Urea; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-Cl pH 4,5
- **Buffer A:** 50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol pH 8,0; 1% Triton X-100; 10% Glicerol
- **Buffer de Lavado:** 50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol pH 8,0; 1% Triton X-100; 10% Glicerol
- **Buffer de Elución:** 50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 300 mM Imidazol pH 8,0; 1% Triton X-100; 10% Glicerol

### 3.2. Amplificación y purificación del gen *tcnth1* de *Trypanosoma cruzi*

En base a la secuencia del genoma de *T. cruzi* de la cepa CL Brener<sup>1</sup>, disponible en la base de datos, se identificó la región que codifica para la DNA glicosilasa NTH1 (NCBI, GenBank accession: 71412347). A partir de la secuencia de dicha región, se diseñaron partidores específicos para amplificar la secuencia nucleotídica de *tcnth1* mediante PCR (Tabla 2), utilizando el vector pYUKO-*tcnth1* como molde, el cual fue generado previamente en el laboratorio por Santiago Ramírez, como parte del trabajo de su Tesis de pregrado.

**Tabla 2: Partidores empleados para la amplificación del gen *tcnth1***

Sentido	5'-CGGGATCCATGAAGAAGCATGCGTTC*	T <sub>m</sub> = 62,9°C
Antisentido	5'-CCC AAGCTTTCACCGGGTATCGACAT*	T <sub>m</sub> = 63,4°C

\*Las secuencias en rojo indican los sitios de corte enzimático. Partidor sentido: *Bam* HI y antisentido: *Hind* III

Para la reacción de PCR se utilizó la DNA polimerasa Taq *Hot Start* (Promega) bajo las siguientes condiciones: 20 ciclos de denaturación 95°C x 30 s, hibridación 59°C x 30 s, extensión 72°C x 90 s; seguido de 20 ciclos de denaturación 95°C x 30 s, extensión 72°C x 90 s. Por último, una extensión final de 72°C x 5 min. La amplificación fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa, en buffer TBE a 90 Volts por ~40 min. La visualización de las bandas se realizó con *GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) en el transiluminador UV. La banda correspondiente a la secuencia de interés fue purificada a partir del gel utilizando el kit *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante.

<sup>1</sup> Al momento de diseñar los partidores, la secuencia genética de NTH1 de *T. cruzi* cepa Dm28c no estaba disponible en las bases de datos. Por ello, se utilizó la cepa CL Brener como referencia.

### 3.3. Ligación del producto de PCR en el vector pQE-80L

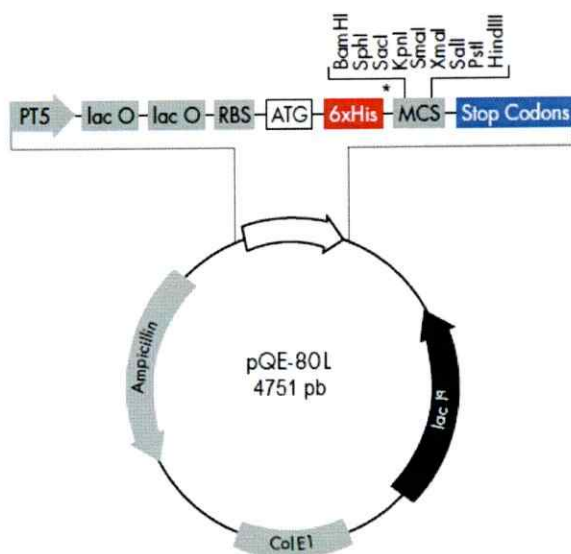
El producto de PCR se sometió a digestión con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III (15,5 µl producto de PCR, 2 µl buffer de restricción E (Promega), 0,5 µl BSA 10 mg/ml y 1 µl de cada enzima de restricción a 37°C por 4 hrs.). La muestra obtenida fue cuantificada con el kit *Quant-iT<sup>TM</sup> dsDNA Broad-Range Assay* (LifeTechnologies), según las indicaciones del fabricante. El fragmento obtenido fue insertado en el vector de expresión bacteriana pQE-80L (QIAGEN) (Figura 6), el cual fue tratado previamente con las mismas enzimas de restricción bajo las mismas condiciones que el inserto y purificado a partir de un gel de agarosa como se indicó anteriormente. Para la reacción de ligación se incubaron 2 µl DNA ligasa T4 (Promega), 2 µl buffer de ligación 10x (Promega), 0,5 µl ATP 100 mM, 80 ng vector pQE-80L, 126ng *tcnht1* y 10 µl H<sub>2</sub>O destilada libre de nucleasas a 4°C toda la noche. El DNA ligado fue precipitado en 1 µl glucógeno 20 ng/ml, 2 µl acetato de sodio 3 M pH 5,2, 60 µl de etanol 100% por 2 hrs a -20°C. Luego se centrifugó a 15000g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se conservó el precipitado el cual fue secado a 37°C por 15 min. Por último, el precipitado seco se resuspendió en 10 µl H<sub>2</sub>O destilada libre de nucleasas.

### Clonamiento de la construcción pQE-80L-*tcnht1* en *E. coli* JM109

Se electroporaron bacterias *Escherichia coli* JM109 electrocompetentes con la construcción pQE-80L-*tcnht1*. Para ello, se agregó 5 µl de la construcción mencionada en un tubo que contenía 40 µl de bacterias electrocompetentes, las que luego fueron transferidas a una cubeta de electroporación, para aplicar un pulso eléctrico de 1,8



kVolts por ~5 ms. Rápidamente, se colocó 750  $\mu$ l de medio LB en la cubeta, se resuspendió y se transfirió a un tubo Eppendorf para dejarlo en agitación por 1 hr a 37°C. Luego de ese tiempo, se sembraron 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l de bacterias transformadas en placas de Petri con medio LB-amp agar y el cultivo se incubó a 37°C toda la noche.



**Figura 6: Vector de expresión en bacteria pQE-80L.** El plásmido tiene un tamaño de 4.751 pb. Presenta una secuencia que codifica  $\beta$ -lactamasa (Ampicillin), la cual otorga resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas, una secuencia que codifica la proteína represora lac I (**lac I<sup>q</sup>**) y el origen de replicación bacteriano **ColE1**. También se muestran el promotor del fago T5 (**PT5**), la secuencia operadora del operon lac (**lac O**), la secuencia de unión al ribosoma (**RBS**), el codón de inicio (**ATG**), una secuencia codificante para un tag de histidinas (**6xHis**), el sitio de clonamiento múltiple (**MCS**) y secuencias para el término de la transcripción (**Stop Codons**) (Imagen extraída de Qiagen).

### 3.4. Selección de colonias transformadas

Se seleccionaron 20 colonias y se cultivaron tres réplicas de cada colonia seleccionada en una placa de Petri con medio LB-amp agar a 37°C toda la noche. Se realizó un PCR de colonia para comprobar la inserción de la secuencia *tcnht1* en el vector pQE-80L, mediante electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE. A partir de esto, se realizó una selección entre los 20 clones bacterianos analizados, con el fin de realizar una extracción plasmidial y un ensayo de restricción.

Para la extracción plasmidial, se cultivó *E. coli* JM109 pQE-80L-*tcnth1* seleccionadas en 10ml medio LB-amp a 37°C en agitación toda la noche. Se realizó una extracción de la construcción con el kit *QIAprep*<sup>®</sup> *Spin Miniprep* (Qiagen), según el protocolo indicado por el fabricante. El plásmido fue empleado para realizar un PCR, utilizando la DNA polimerasa *Taq Hot Start 12,5* (Promega). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al en buffer TBE.

Para obtener el inserto, se realizó un análisis de restricción donde se incubaron 16,5 µl pQE-80L-*tcnth1*, 1 µl buffer de restricción E (Promega), 0,5µl BSA 10mg/ml, 0,5 µl *Bam* HI (Promega), 0,5 µl *Hind* III (Promega) a 37°C por 4 hrs. El fragmento liberado fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE.

Finalmente, las muestras seleccionadas fueron analizadas mediante secuenciación automática de DNA y comparadas mediante alineamiento de secuencias.

### **3.5. Transformación de *E. coli* BL21 con la construcción pQE-80L-*tcnth1* e inducción de la expresión de TcNTH1**

Se electroporaron bacterias *E. coli* BL21 electrocompetentes con la construcción pQE-80L-*tcnth1*. Se seleccionaron a través de PCR de colonia 3 clones bacterianos para inducir la expresión de la proteína TcNTH1 mediante IPTG (cultivo de *E. coli* BL21 pQE-80L-*tcnth1* en 10 ml medio LB-amp, 2 µl de IPTG 1 mg/ml a 37°C en agitación toda la noche). Luego, los cultivos fueron centrifugados a 7000g por 15 min y el precipitado fue resuspendido en 400 µl de buffer PBS para ser lisado mediante ultrasonido con el sonicador a potencia máxima por 90 s en hielo. Con las muestras

obtenidas se realizó un SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, inmersos en 500 ml de buffer de corrida. La electroforesis se desarrolló a 60 volts durante 20 min y luego a 90 volts por 150 min. Transcurrido este tiempo, uno de los geles fue teñido con azul de *Coomassie* toda la noche. Una vez finalizado esto, al gel teñido se le realizaron 4 lavados con solución de destinción. Al otro gel se le realizó un Western Blot y para ello fue sometido a 120 volts por 60 min a 4°C en buffer de transferencia en contacto con una membrana de nitrocelulosa. Esta se incubó en solución de Solución de Bloqueo Leche 5% toda la noche a 4°C. Posteriormente, fue incubada con el anticuerpo primario (PBS-T Leche 1% y anti-His (Clontech) 1:4.000 (v/v)) a temperatura ambiente por 2 hrs. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-Tween y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario (PBS-Tween, *Goat anti-Mouse* HRP (Jackson ImmunoResearch) 1:10.000 (v/v)) a temperatura ambiente por 60 min. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a realizar 3 lavados de 5 min con PBS-Tween y luego las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia, para lo cual fueron incubadas con los reactivos del kit *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), como señala el fabricante.

### **3.6. Purificación parcial de TcNTH1 recombinante en condiciones denaturantes**

A partir de los ensayos de SDS-PAGE y Western Blot, se seleccionó aquel clon bacteriano que presentaba una mayor expresión de la proteína TcNTH1 al ser inducido. Este clon fue cultivado en 200ml de medio LB-amp a 37°C en agitación. Al alcanzar

una  $DO_{600nm}$  entre 0,6 y 0,8 el cultivo fue inducido con 0,5 mM IPTG (Promega) y se dejó a 37°C en agitación toda la noche. Luego el cultivo fue centrifugado a 2370g por 20 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en 10 ml de buffer de lisis B y se dejó en agitación a 4°C durante 30 min, para ser posteriormente lisado mediante ultrasonido a máxima potencia por 3 min en hielo. La muestra fue sometida a centrifugación a 6080g por 20 min a 4°C y se rescató el sobrenadante. Previamente, se preparó una columna de purificación con 500  $\mu$ l de resina empaquetada *HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA Resin* (Thermo Scientific), la que fue equilibrada con 5 ml de buffer de lisis B. El sobrenadante fue pasado dos veces por la columna y luego se procedió a lavar la columna con 10 ml del buffer de lavado C. Finalmente, se eluyó la columna con buffer de elución E, tomando fracciones de  $\sim$ 500  $\mu$ l. Se comprobó la presencia de proteínas con el método Bradford (500  $\mu$ l de Reactivo Bradford (BioRad) más 100  $\mu$ l de fracción eluida). Las diferentes fracciones colectadas fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y Western Blot, para posteriormente ser dializadas en buffer PBS a 4°C toda la noche en bolsas *Spectra/Por<sup>®</sup>* MW: 14000.

### 3.7. Inmunización de ratones

Se inmunizaron tres hembras *Mus musculus* BALB/c de 6 semanas de edad y un individuo control, mediante inyección intraperitoneal. Para ello, el volumen correspondiente a 50  $\mu$ l de TcNTH1 (antígeno) fue mezclado con 175  $\mu$ l de *Freund's Adjuvant* (SIGMA-ALDRICH), completando hasta 350  $\mu$ l con buffer PBS. La emulsión fue homogeneizada mediante vórtex por 10 min. La inmunización se realizó como se

detalla en la Tabla 3, para luego extraer el total de la sangre mediante punción cardiaca 4 semanas después de la 4<sup>a</sup> cuarta inoculación. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 10 min y luego centrifugadas a 13680g por 20 min a 4°C. Se rescató el sobrenadante (suero), el cual fue suplementado con glicerol 10%(v/v) y almacenado a -80°C. Uno de los ratones inmunizados desarrolló una ascitis de manera espontánea que persistió hasta el momento en que fueron sacrificados, por lo que se extrajo el líquido ascítico mediante punción del peritoneo y la muestra fue sometida al mismo tratamiento que la sangre extraída.

**Tabla 3: Esquema de inmunización de ratones**

	1 <sup>a</sup> Inoculación	2 <sup>a</sup> Inoculación	3 <sup>a</sup> Inoculación	4 <sup>a</sup> Inoculación
Día	1	8	15	22
Adyuvante Freund	Completo	Incompleto	Incompleto	Incompleto
Cantidad Antígeno (µg)	~50	~50	~50	~50
Volumen Inyección (µl)	350	350	350	350

### 3.8. Evaluación y titulación de anticuerpos policlonales

Se realizaron cultivos de *E. coli* BL21 pQE-80L-*tenth1* inducidos con IPTG (Promega) y sin inducir en medio LB-amp. Las muestras fueron lisadas con ultrasonido con sonicador a potencia máxima por 90 s en hielo, y se cuantificaron las proteínas totales con el kit *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay* (Pierce), según protocolo del fabricante. Se realizó un Western Blot con las muestras obtenidas y con la proteína TcNTH1 recombinante purificada, utilizando como anticuerpo primario antisuero o líquido ascítico de ratón inmunizado en una dilución 1:5.000 (v/v) en PBS-T BSA 2%.

Posteriormente, el anticuerpo primario (líquido ascítico) fue titulado a diferentes diluciones (1:2.000, 1:3.000, 1:4.000 y 1:5.000 (v/v) en PBS-T BSA 2%) mediante



Western Blot, a partir de 40  $\mu$ g de proteínas totales de lisados de epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c *wild type* y epimastigotes 8xHis-TcNTH1 de *T. cruzi* Dm28c, estos últimos generados por Camila Barrientos, como parte del trabajo de su Tesis de pregrado.

### **3.9. Identificación de la enzima TcNTH1 en las diferentes formas celulares de *Trypanosoma cruzi***

Se realizó un Western Blot con 40  $\mu$ g de proteínas totales de lisados de epimastigote, tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* Dm28c *wild type*. Como anticuerpo primario se emplearon los anticuerpos policlonales en PBS-T BSA 2%, dilución líquido ascítico 1:2.000 (v/v). Una vez que la membrana fue revelada, se sometió a *stripping* o eliminación de los anticuerpos. Para ello, se realizaron 2 lavados de la membrana con buffer *mild stripping* de 5-10 min. Luego la membrana se lavó 2 veces con buffer PBS por 10 min y finalmente se lavó 2 veces con buffer TBS-T por 5 min, para continuar con la etapa de bloqueo con la Solución de Bloqueo BSA 5%. La membrana fue incubada con anti- $\alpha$ -tubulina (Clontech) 1:1.000 (v/v) en PBS-T BSA 2%, a modo de control de carga.

### **3.10. Purificación parcial de TcNTH1 recombinante en condiciones nativas**

Se indujo la expresión de TcNTH1 en 200 ml de cultivo BL21 pQE-80L-*tcnth1* mediante IPTG como se detalló en secciones anteriores. El cultivo fue centrifugado y lisado con ultrasonido, como se indicó anteriormente. El sobrenadante fue pasado 2

veces por la columna con 500  $\mu$ l de resina empaquetada *HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA Resin* (Thermo Scientific), equilibrada previamente con buffer A. Luego se procedió a lavar la columna con 20 ml del buffer de lavado. Finalmente, se eluyó la columna con buffer de elución, tomando fracciones de  $\sim$ 500  $\mu$ l. Las diferentes fracciones colectadas fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y Western Blot, para posteriormente ser dializadas en buffer PBS a 4°C toda la noche en bolsas *Spectra/Por<sup>®</sup>* MW: 14000.

### 3.11. Ensayo de actividad de la enzima TcNTH1

Se diseñaron 2 oligonucleótidos sintéticos de 32 mer y 25 mer, con una timina glicol (Tg) en la posición 18 mer y uracilo (Ura) en la posición 8 mer, respectivamente (Tabla 4). Los oligonucleótidos fueron marcados con <sup>32</sup>P en el extremo 5', usando el kit *DNA 5' End Labeling System* (Promega), como señala el fabricante. Las sondas marcadas fueron incubadas con la enzima TcNTH1 purificada parcialmente en condiciones nativas y con los correspondientes controles (1  $\mu$ l de sonda marcada, 1  $\mu$ g TcNTH1 o 0,5  $\mu$ g TcAP1 o 1 U enzima control (Exonucleasa III o Endonucleasa III, ambas de *E. coli*, New England Biolabs), 2  $\mu$ l buffer de reacción Endo III 10x (New England Biolabs) en 20  $\mu$ l totales de reacción. A la mezcla con TcAP1 se agregó MgCl<sub>2</sub> para alcanzar una concentración de 5 mM. Las preparaciones fueron incubadas a 37°C por 60 min. La sonda con uracilo fue tratada previamente con la enzima UDG para generar el sitio AP (1 U UDG (New England Biolabs), 1  $\mu$ l de sonda marcada Ura, 2  $\mu$ l buffer de reacción Endo III 10x (New England Biolabs) en 5  $\mu$ l totales de reacción incubadas a 37°C por 30 min). La reacción se detuvo con la adición de 10  $\mu$ l de buffer carga de

DNA a 95°C por 10 min. Las muestras fueron separadas electroforéticamente en geles denaturantes de acrilamida-urea a 40 Watts por ~45 min. Posteriormente, la radiactividad fue detectada utilizando un equipo *Phosphorimager* (Biorad).

**Tabla 4: Sondas con bases modificadas utilizadas en el ensayo de actividad**

Oligo Timina glicol (Tg)	5'-CCGGTGCATGACACTGTTACCTATCCTCAGCG-3' *
Oligo Uracilo (Ura)	5'-CCGCTAGUGGGTACCGAGCTCGAAT-3' *

\*En rojo se indican las bases modificadas de los oligonucleótidos. La base apareada con Tg en la hebra complementaria es A, y la base apareada con U es G.

### 3.12. Análisis Bioinformático

Se realizó un alineamiento de múltiples secuencias mediante el programa ClustalW2 (Thompson y col., 1994). En la página web del programa, se utilizaron los parámetros presentes por default, con excepción de la penalidad de Gap Open, que fue aumentada de 10 a 25.

El modelamiento tridimensional de proteínas por homología se llevó a cabo mediante el servidor Phyre V 2.0. Este programa utiliza una librería de estructuras de proteínas conocidas, tomadas de las bases de datos *Structural Classification of Proteins* (SCOP) y *Protein Data Bank* (PDB). La secuencia *query* es escaneada contra la base de datos de secuencias no redundantes mediante PSI-BLAST para generar un perfil de alineamiento. Luego Phyre V 2.0 utiliza tres programas independientes para predecir estructuras secundarias: Psi-Pred, SSProd y JNet. Cada uno de estos tres programas proporciona un valor de confianza en cada posición de la secuencia *query* para los tres estados de estructuras secundarias (alfa hélice, lámina beta o giros beta). Por último, los



valores de confianza se promedian para establecer el modelo tridimensional (Kelley & Sternberg, 2009).

La identificación de las funciones de residuos aminoacídicos se realizó mediante la base de datos *Conserved Domain Database* (CDD). Ésta almacena los modelos de estructuras tridimensionales que se encuentran en otras bases de datos como Pfam y SMART. Mediante alineamiento de secuencia determina los residuos conservados e identifica regiones funcionales de la proteína (Marchler-Bauer y col., 2013).

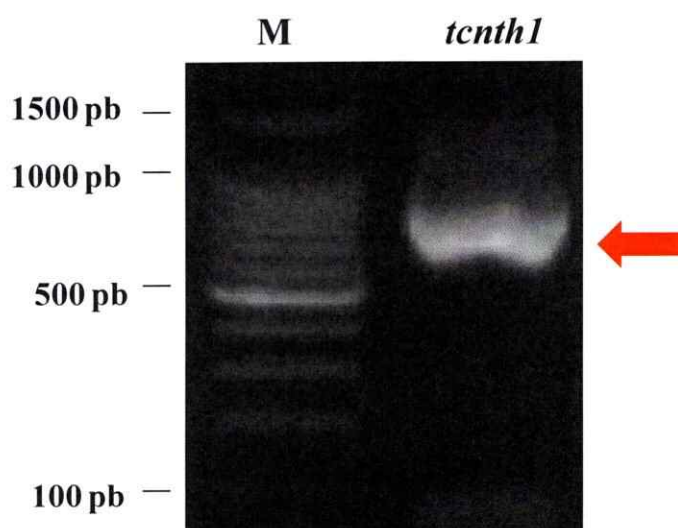
La identificación de residuos catalíticos se realizó mediante la base de datos *Catalytic Site Atlas* (CSA), la que compara la secuencia *query* con la secuencia de proteína cuya estructura tridimensional ha sido determinada, para encontrar residuos catalíticos conservados (Furnham y col., 2014).

Por último, la determinación de los bolsillos o cavidades de los modelos enzimáticos, fueron obtenidos mediante el programa Fpocket. Este programa se basa en el concepto de alfa esferas, las cuales son esferas que presentan cuatro átomos en su perímetro y no contienen átomos su interior. En primer lugar el programa determina todo el ensamblaje de alfa esferas en la estructura de la proteína, luego mediante teselación de Voronoi, identifica las principales agrupaciones de alfa esferas. Los centros de las esferas son asignados a los vértices en los cuales las regiones de Voronoi intersectan. Finalmente, el programa selecciona las zonas definidas por agrupaciones de alfa esferas que presentan un ensamblaje ajustado y un tamaño intermedio con respecto al resto de las esferas generadas (Le Guilloux y col., 2009).

## 4. RESULTADOS

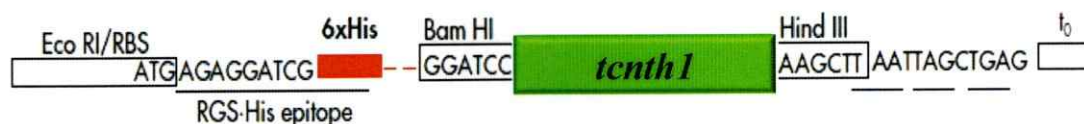
### 4.1. Amplificación y clonamiento del gen codificante para la DNA glicosilasa NTH1 de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c

La secuencia codificante de la proteína TcNTH1 (756 pb) se amplificó mediante PCR a partir del vector pYUKO-*tenth1* (Figura 7), el cual se generó previamente en el laboratorio, utilizando como templado el vector pGEM-*tenth1*. Para la obtención de la construcción pGEM-*tenth1*, se amplificó la secuencia del gen *tenth1* a partir del genoma de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c, mediante PCR. El producto obtenido se insertó directamente en el vector pGEM-T, sin previo tratamiento con enzimas de restricción.



**Figura 7:** Amplificación del gen codificante de la DNA glicosilasa NTH1 de *Trypanosoma cruzi*. La flecha roja indica la banda correspondiente al gen *tenth1*. **M:** marcador de pares de bases (*BenchTop 100bp DNA Ladder*, Promega).

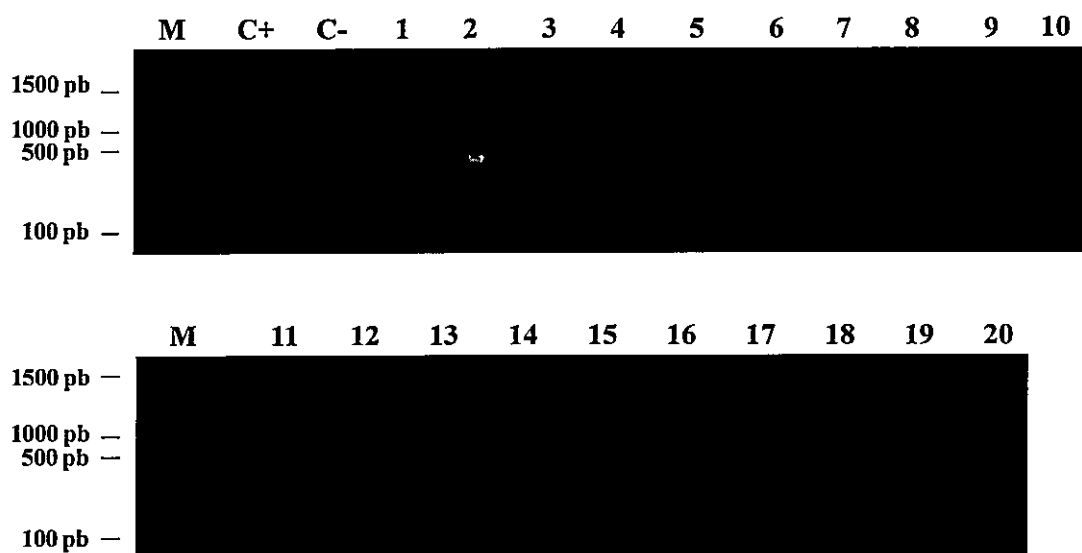
El producto de PCR fue purificado desde el gel de agarosa para ser sometida a digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. Los sitios de restricción que reconocen estas enzimas fueron incluidos previamente en el fragmento obtenido de *tcnth1* mediante los partidores diseñados para su amplificación. El fragmento tratado con las enzimas, fue ligado en el vector de expresión pQE-80L utilizando la ligasa de fago T4. Este vector genera una proteína de fusión con un *tag* de 6xHis en el extremo N-terminal de la proteína de interés (Figura 8), lo que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad y permite su reconocimiento en ensayos Western Blot con anticuerpos anti-His.



**Figura 8: Construcción pQE-80L-*tcnth1*.** El gen que codifica para la DNA glicosilasa NTH1 de *T. cruzi* (*tcnth1*) se insertó entre los **sitios de restricción** de las enzimas **Bam HI** (5'GGATCC3') y **Hind III** (5'AAGCTT3'). La transcripción comienza en el **codón de inicio** ATG y río abajo de este codón se encuentra un sitio de restricción para *Eco RI* y el sitio de unión al ribosoma (**RBS**). Río arriba del codón de inicio se encuentra la secuencia que expresa el **epítipo RGS-His**, el cual posee un *tag* de 6 histidinas. Al final de la secuencia, se muestra la región de terminación transcripcional del fago  $\lambda$  (**lambda t<sub>0</sub>**) (Imagen modificada de Qiagen).

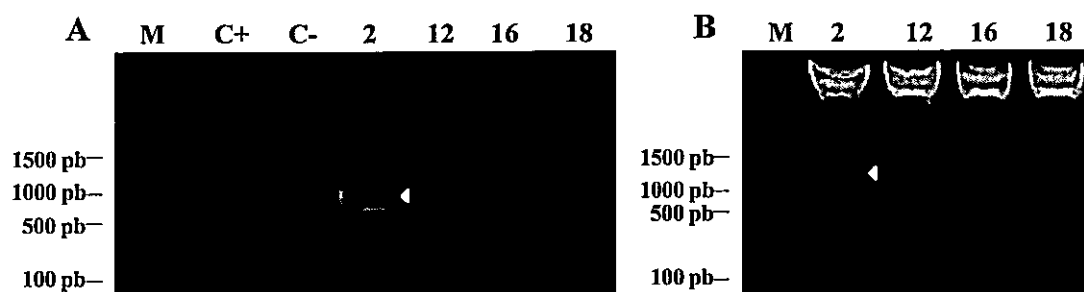
La construcción obtenida se clonó en *E. coli* JM109, la cual es una cepa ideal para la generación de múltiples copias de DNA plasmidial de alta calidad. Esta cepa lleva la mutación *recA1*, la que permite una recombinación mínima controlada, contribuyendo en la estabilidad del plásmido, y la mutación *endA1*, que proporciona una alta calidad en la obtención del plásmido (Yanisch-Perron y col., 1985).

En la Figura 9 se muestra el PCR de colonia de los clones bacterianos transformados con la construcción pQE-80L-*tcnH1* que fueron seleccionados mediante resistencia a antibiótico (ampicilina). Todos los clones bacterianos seleccionados presentaron una banda entre los 500 y 1500 pb. Se seleccionaron entre éstos, los clones 2, 12, 16 y 18 basándose en la intensidad de la banda para continuar con los ensayos de digestión y amplificación del gen *tcnH1* a partir de la construcción pQE-80L-*tcnH1*. Cabe destacar que el clon 2 es el que presenta la banda más intensa entre las muestras seleccionadas (Figura 9).



**Figura 9:** Selección de clones de *E. coli* JM109 transformados con la construcción pQE-80L-*tcnH1*. Se realizó un PCR de colonia de las bacterias transformadas con los mismos partidores utilizados para la obtención del gen desde pYuko-*tcnH1*. **M:** marcador de pares de bases (*BenchTop 100bp DNA Ladder*, Promega), **C-:** control negativo que no contiene DNA, **C+:** control positivo que muestra la amplificación de *tcnH1* a partir del vector pGEM-*tcnH1*. Los carriles enumerados del 1 al 20 muestran los diferentes clones bacterianos seleccionados para realizar este PCR de colonia. Se seleccionaron los clones 2, 12, 16 y 18 para la extracción plasmidial.

Los clones bacterianos seleccionados fueron sometidos a extracción de la construcción pQE-80L-*tcnht1*, para realizar un PCR convencional y una digestión de la construcción. Esto permite corroborar que la secuencia de interés (gen *tcnht1*) está presente en la construcción. Entre los cuatro clones bacterianos seleccionados mediante PCR de colonia, sólo el clon 2 presentó una banda nítida en la amplificación a partir del plásmido extraído. Además, la digestión con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III permitió visualizar la liberación del fragmento *tcnht1* desde la construcción pQE-80L-*tcnht1* nuevamente sólo desde el clon 2 (Figura 10).



**Figura 10: Amplificación de *tcnht1* y digestión de la construcción pQE-80L-*tcnht1*.** En la imagen A se observa la amplificación de *tcnht1* a partir de la construcción pQE-80L-*tcnht1* extraída de los clones seleccionados. C-: control negativo que no contiene DNA, C+: control positivo que muestra la amplificación de *tcnht1* a partir del vector pGEM-*tcnht1*. La imagen B muestra la digestión de la construcción pQE-80L-*tcnht1*. Es posible observar que sólo el clon 2 libera el fragmento que correspondería al gen *tcnht1*. M: marcador de pares de bases (*BenchTop 100bp DNA Ladder*, Promega). En ambas imágenes, los carriles con los números 2, 12, 16 y 18 corresponden a los clones bacterianos seleccionados a partir del PCR de colonia. El símbolo rojo (◄) indica la banda del gen *tcnht1* presente en el clon 2.

#### 4.2. Análisis bioinformático de la secuencia génica y aminoacídica de la DNA glicosilasa NTH1 de *Trypanosoma cruzi*

La construcción pQE-80L-*tcnth1* fue extraída a partir el clon 2 y se envió a secuenciar. La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia *nth1* de *Trypanosoma cruzi* Dm28c disponible en el *European Nucleotide Archive* (ENA, ESS67492) mediante el programa ClustalW2, como se observa en la Figura 11. Ambas secuencias difieren en sólo dos nucleótidos, presentando un porcentaje de identidad de 99,7%. La secuencia templada presenta un codón CAT que codifica para His102, pero en la secuencia obtenida este codón se modificó a CGT codificante para Arg102 (sustitución sinónima), aminoácido que se encuentra en una región de unión al sustrato. Además ocurrió una mutación silenciosa, ya que se modificó el codón GGG del templado por GGA de la secuencia obtenida. Ambos codones codifican para el aminoácido Gly206.

A partir de la secuencia nucleotídica obtenida del gen *nth1* de *T. cruzi*, se obtuvo la secuencia aminoacídica derivada, mediante el programa ACBB (*Applied Computational Biology and Bioinformatics*). Mediante el programa ClustalW2, se comparó la secuencia proteica obtenida de la NTH1 de *T. cruzi* con la secuencia de la proteína NTH1 de *Homo sapiens* (NCBI, GenBank accession: NP\_002519.1) y la secuencia de la proteína NTH1 de *Bacillus stearothermophilus*, una enzima cuya estructura se conoce por cristalografía de rayos X (PDB, accession code: 1ORN) (Fromme & Verdine, 2003).

T. cruzi Dm28c	-----ATGAAGAAGC	10
pQE-80L-nth1	CTGGAGGGATTACTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGAAGAAGC	60
	*****	
T. cruzi Dm28c	ATGCGTTCAAGCCACCGCCCAACTGGGAGAGGTTGTACGTCAGGGTGAAGGAACTCCGCG	70
pQE-80L-nth1	ATGCGTTCAAGCCACCGCCCAACTGGGAGAGGTTGTACGTCAGGGTGAAGGAACTCCGCG	120
	*****	
T. cruzi Dm28c	AGGGGCTGGAGGCTCCGGTAGACACACTGGGATGCTCGAAACTCTTTGATAAAGCAGCGT	130
pQE-80L-nth1	AGGGGCTGGAGGCTCCGGTAGACACACTGGGATGCTCGAAACTCTTTGATAAAGCAGCGT	180
	*****	
T. cruzi Dm28c	TGCACGAGACGAGACGGTATCATATCCTATTGGCTCTCATGCTGAGTCTCAGACAAAAG	190
pQE-80L-nth1	TGCACGAGACGAGACGGTATCATATCCTATTGGCTCTCATGCTGAGTCTCAGACAAAAG	240
	*****	
T. cruzi Dm28c	ATCATGTGACGGCGGCGCAATGCACGCCCTTATTCGAATCGGGTGTACCCTGAAGTGA	250
pQE-80L-nth1	ATCATGTGACGGCGGCGCAATGCACGCCCTTATTCGAATCGGGTGTACCCTGAAGTGA	300
	*****	
T. cruzi Dm28c	TAGCGAAGATGCCGAGAAGACACTTGATGGATTATTTCCAAAGTAGGCTTT	310
pQE-80L-nth1	TAGCGAAGATGCCGAGAAGACACTTGATGGATTATTTCCAAAGTAGGCTTT	360
	*****	
T. cruzi Dm28c	AAAAGGCTAAACATATTAAGAGGCGACAGATGCTATTTGAAAAGGCATCAAGGGAGGG	370
pQE-80L-nth1	AAAAGGCTAAACATATTAAGAGGCGACAGATGCTATTTGAAAAGGCATCAAGGGAGGG	420
	*****	
T. cruzi Dm28c	TGCCGCATTCATACGAGGATCTCATTGCGCTTCCCGGCATTGGTCCCAAGATGGCCCATC	430
pQE-80L-nth1	TGCCGCATTCATACGAGGATCTCATTGCGCTTCCCGGCATTGGTCCCAAGATGGCCCATC	480
	*****	
T. cruzi Dm28c	TGTTTCTCCAGGAAGCAGACGGAGTGGTGTGGGCATTGGTGTGGATACCCACGTTCCACC	490
pQE-80L-nth1	TGTTTCTCCAGGAAGCAGACGGAGTGGTGTGGGCATTGGTGTGGATACCCACGTTCCACC	540
	*****	
T. cruzi Dm28c	GCATCAGTCAACGCTTTCTTTGGGTCCCATCGACGGTAAAAACGCCGAAGACACACGAA	550
pQE-80L-nth1	GCATCAGTCAACGCTTTCTTTGGGTCCCATCGACGGTAAAAACGCCGAAGACACACGAA	600
	*****	
T. cruzi Dm28c	AGGCACCTCGAGTCCTGGCTCCCACGGAAGTACTGGGGTGAGATAAATGGACTGCTTGTGG	610
pQE-80L-nth1	AGGCACCTCGAGTCCTGGCTCCCACGGAAGTACTGGGGTGAGATAAATGGACTGCTTGTGG	660
	*****	
T. cruzi Dm28c	GTTTA	670
pQE-80L-nth1	GTTTA	720
	*****	
T. cruzi Dm28c	ATCTATGCCCCAACGCTTTTAAGGAGGCGAAGAGGAGTGAAAAAGAGGCAGGGTGCCTG	730
pQE-80L-nth1	ATCTATGCCCCAACGCTTTTAAGGAGGCGAAGAGGAGTGAAAAAGAGGCAGGGTGCCTG	780
	*****	
T. cruzi Dm28c	ATATCGAAGATGTCGATACCCGGTGA-----	756
pQE-80L-nth1	ATATCGAAGATGTCGATACCCGGTGAAGGCTTAATTAGCTGAGCTTGGGACTCCTGTTGA	840
	*****	

**Figura 11: Alineamiento de la secuencia nucleotídica codificante para NTH1 de *T. cruzi* Dm28c con el producto de secuenciación automática de la construcción pQE-80L-*tnth1*. T. cruzi Dm28c:** secuencia nucleotídica del gen codificante de NTH1 de *T. cruzi* Dm28c. **pQE-80L-*nth1*:** secuencia obtenida por secuenciación automática de la construcción pQE-80L-*tnth1*. En amarillo se destacan los codones modificados con respecto a los codones de la secuencia disponible en la base de datos, señalados de color verde.

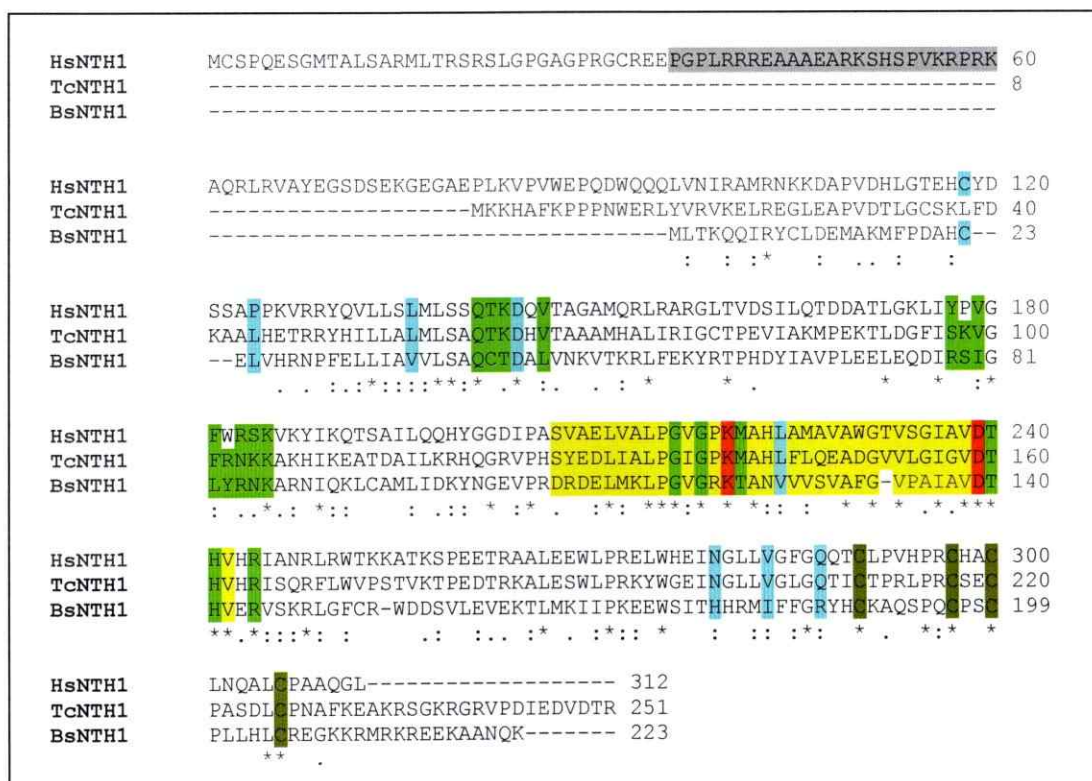
En la Figura 12 se muestra que los principales residuos aminoacídicos implicados en la actividad catalítica de la DNA glicosilasa NTH1 se encuentran en su mayoría muy conservados (Krokan y col., 1997; Fromme & Verdine, 2003; Hazra y col., 2007). El análisis de la función de los residuos aminoacídicos se realizó en base al programa CDD (*Conserve Domain Database*), a la publicación de la estructura cristalográfica de BsNTH1 (Fromme & Verdine, 2003) y a la comparación de estructuras de diferentes DNA glicosilasas (Krokan y col., 1997), según se indica en la Figura 12.

El alineamiento entre las secuencias HsNTH1 y TcNTH1 entrega un porcentaje de identidad de 43%; éste se considera alto teniendo en cuenta la distancia filogenética que existe entre ambos organismos (De Souza, 2002; Karlin & Ladunga, 1994). Por otra parte, la secuencia BsNTH1 presenta un porcentaje de identidad del 24% y 25% con respecto a las secuencias de TcNTH1 y HsNTH1, respectivamente.

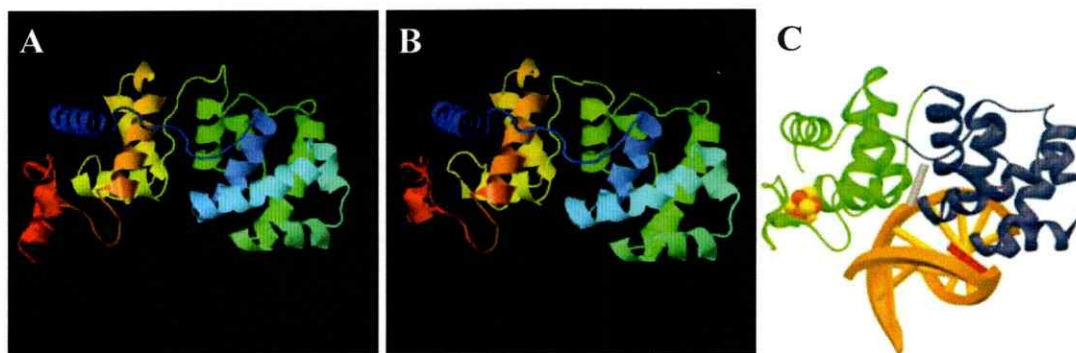
Con el fin de comparar la estructura de ambas enzimas, se realizó un modelamiento tridimensional por homología de la NTH1 de *Homo sapiens* y de *T. cruzi*, mediante el programa Phyre V 2.0 (*Protein Homology/analogy Recognition Engine*). Como molde se utilizó la endonucleasa III (NTH1) de *Bacillus stearothermophilus*, obtenida mediante cristalografía de rayos X (Fromme & Verdine, 2003).

La estructura tridimensional de la enzima NTH1 de *B. stearothermophilus*, presenta sólo estructuras secundarias de  $\alpha$ -hélice distribuidas en dos dominios que envuelven al dúplex de DNA (Figura 13). Los modelos generados de la NTH1 de *T. cruzi* y *H. sapiens* presentaron una cobertura de 84% y 71% respectivamente, con respecto a la NTH1 de *B. stearothermophilus*. No se modeló la región N-terminal de HsNTH1 (aa 1-88), ni de TcNTH1 (aa 1-23), debido a que no eran homólogos con respecto a BsNTH1.



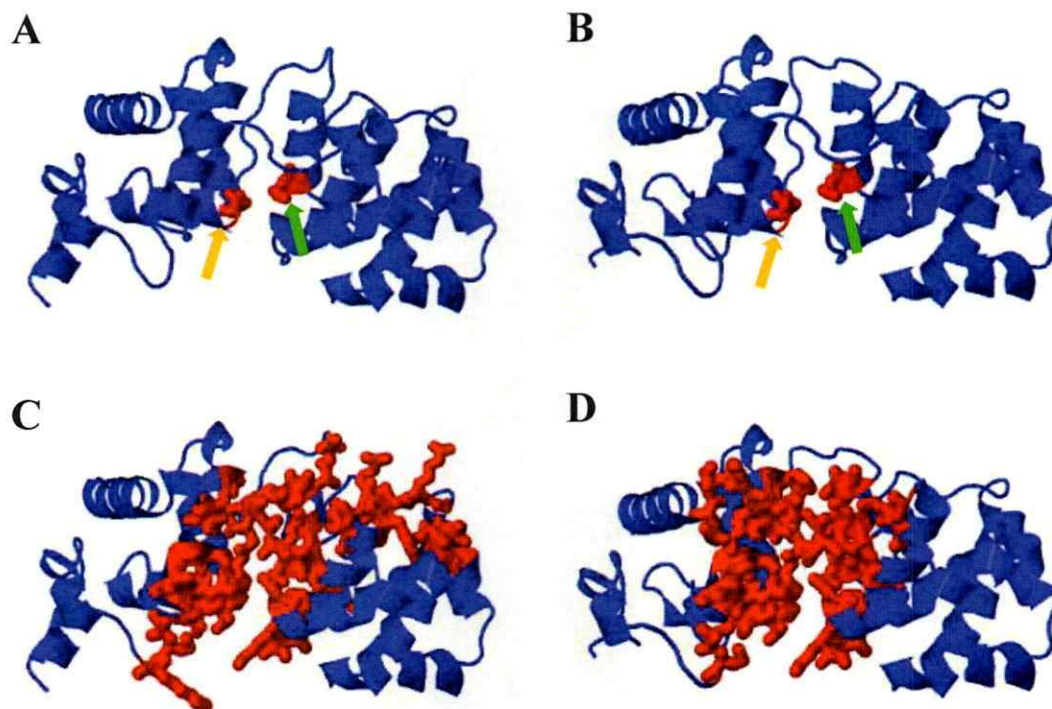


**Figura 12: Alineamiento de la proteína NTH1 de *Trypanosoma cruzi* con la secuencia aminoacídica de NTH1 de *Homo sapiens* y *Bacillus stearothermophilus*.** Comparación de la secuencia proteica de la DNA glicosilasa NTH1 de humano y *B. stearothermophilus* con la secuencia aminoacídica derivada de la DNA glicosilasa NTH1 de *T. cruzi* obtenida a partir de la secuencia nucleotídica. **HsNTH1:** Proteína NTH1 de *Homo sapiens*. **TcNTH1:** Proteína NTH1 de *Trypanosoma cruzi*. **BsNTH1:** Proteína NTH1 de *Bacillus stearothermophilus*. En rojo se señalan los residuos claves en la actividad catalítica (CDD; Krokan y col., 1997; Fromme & Verdine, 2003), en celeste se indican los residuos que constituyen el bolsillo que detecta la base oxidada (CDD; Fromme & Verdine, 2003), en verde se muestran los residuos que participan en el reconocimiento y unión al DNA (CDD; Fromme & Verdine, 2003), en amarillo se señala el motivo hélice-horquilla-hélice (HhH) presente en estas DNA glicosilasas (Krokan y col., 1997; Fromme & Verdine, 2003; Hazra y col., 2007), en café se indica la región de unión al cluster  $[4Fe-4S]^{2+}$  (CDD; Fromme & Verdine, 2003), en gris se muestra la señal de localización nuclear bipartita (CDD).



**Figura 13: Comparación de los modelos tridimensionales de NTH1 de *Trypanosoma cruzi* y NTH1 de *Homo sapiens*.** Se realizó el modelo estructural por homología de la enzima NTH1 de *T. cruzi* y *H. sapiens*, utilizando como molde para ambas enzimas a la DNA glicosilasa NTH1 de *Bacillus stearothermophilus*. La NTH1 de esta bacteria es la única perteneciente al grupo de las endonucleasas III cuya estructura ha sido obtenida junto a su sustrato (oligonucleótido con una base dañada), mediante cristalografía de rayos X. **A:** Modelo NTH1 de *T. cruzi*. **B:** Modelo NTH1 de *H. sapiens*. Los modelos están coloreados según el espectro electromagnético visible inverso, desde el extremo amino terminal (azul) hasta el carboxilo terminal (rojo). **C:** Estructura cristalográfica de la NTH1 de *B. stearothermophilus*. Los dos dominios de Endo III se muestran en verde y azul; el cluster  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$  se muestra en formato CPK (Fe, óxido; S, amarillo); el dúplex de DNA se muestra amarillo, con el nucleótido dañado en gris y el nucleótido con el que aparee, en rojo (Fromme & Verdine, 2003).

Por otra parte, se comparó la posición de los residuos que participan en la actividad catalítica y en la unión al sustrato u otros ligandos, en ambos modelos generados de NTH1 (Figuras 14). Esto permitió determinar que los modelos de NTH1 de *T. cruzi* y *H. sapiens* presentan similitud en sus sitios activos, destacándose la conservación en la posición estructural de los residuos aminoacídicos que llevan a cabo la actividad catalítica: Lisina (Lys140 en TcNTH1; Lys220 en HsNTH1) y Ácido Aspártico (Asp159 en TcNTH1; Asp239 en HsNTH1). Además, se observa que los residuos aminoacídicos presentes en el bolsillo de unión al DNA o a otros ligandos, se encuentran entre los dos dominios de la enzima NTH1, presentando una distribución más amplia de residuos en la NTH1 de *T. cruzi* en comparación con NTH1 de *H. sapiens*.



**Figura 14:** Comparación de residuos aminoacídicos que participan en la catálisis y en la unión a ligandos en los modelos de NTH1 de *Trypanosoma cruzi* y *Homo sapiens*. Los modelos obtenidos por homología a partir de Endo III de *B. stearotherophilus* fueron analizados destacando los residuos participantes en el reconocimiento y reparación del DNA dañado. Las imágenes **A** y **B** muestran los modelos de NTH1 de *T. cruzi* y *H. sapiens*, respectivamente. Se destacan los dos residuos que llevan a cabo la catálisis. Con flecha amarilla ácido aspártico y flecha verde lisina. La identificación de estos residuos se realizó mediante el programa CSA (*Catalytic Site Atlas*). Las imágenes **C** y **D** muestran los modelos de NTH1 de *T. cruzi* y *H. sapiens*, respectivamente. Se destaca en rojo los residuos de unión al DNA o a otros ligandos. La identificación de los residuos se realizó mediante el programa Fpocket.

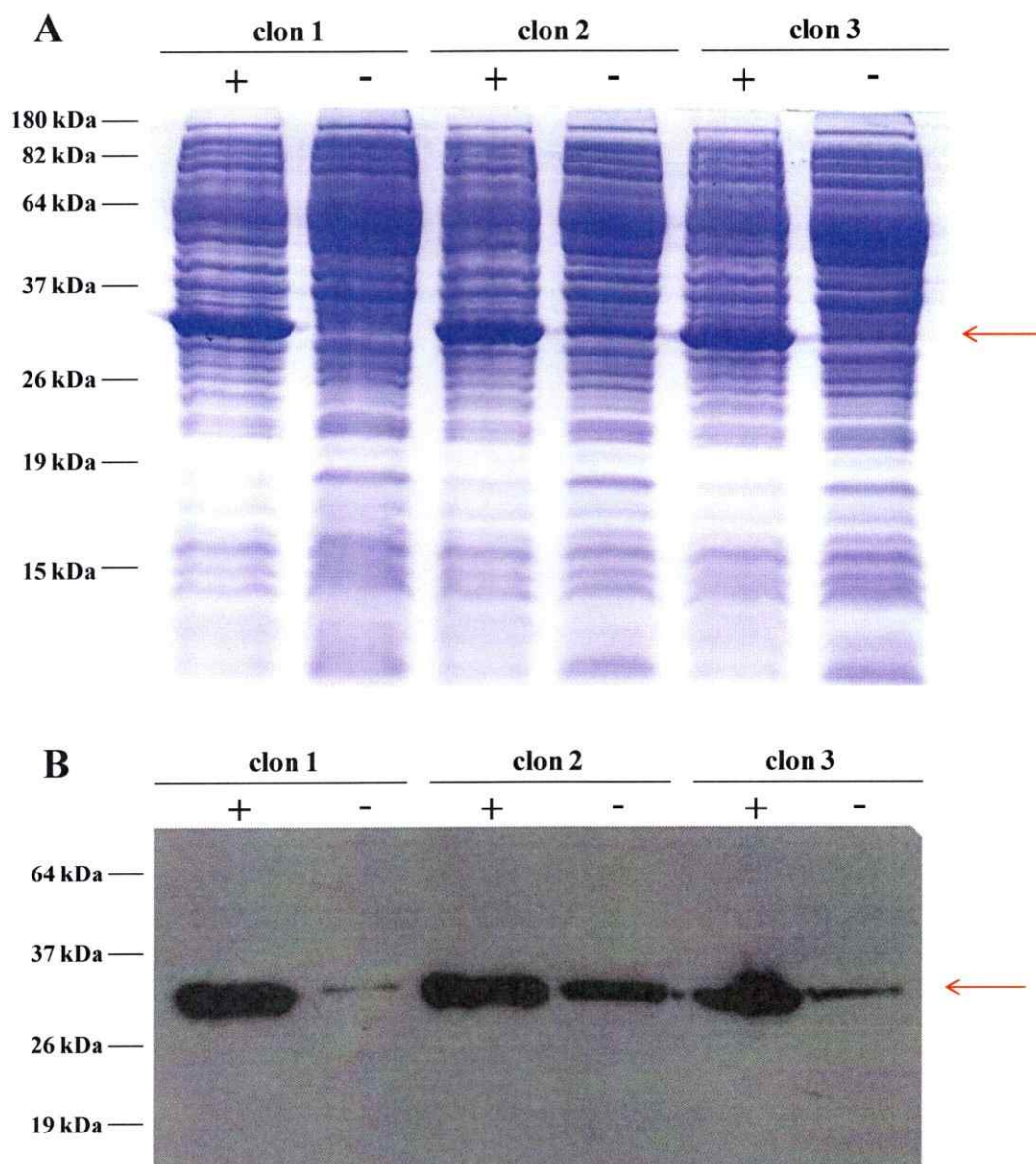
### 4.3. Expresión de TcNTH1 recombinante en bacteria

La proteína TcNTH1 fue expresada en un sistema bacteriano, mediante la transformación de *E. coli* BL21 con la construcción pQE-80L-*tcnth1* obtenida a partir del clon 2 de *E. coli* JM109. La cepa BL21 es un sistema de expresión adecuado para la producción de un alto nivel de proteínas heterólogas. Esta cepa carece de distintas

proteasas que podrían producir la degradación de proteínas heterólogas expresadas en ella (Wood, 1984).

Las bacterias transformadas fueron inducidas con 0,5 mM de IPTG para expresar la proteína TcNTH1, para luego ser comparadas con aquellas bacterias transformadas no inducidas, por medio de SDS-PAGE y Western Blot (Figura 15). Al comparar mediante electroforesis las proteínas totales de los diferentes clones, se observa una banda entre los 26 y 37 kDa en el carril de bacterias inducidas por IPTG que podría corresponder a la proteína TcNTH1, ya que esta banda no se encuentra presente en el carril de bacterias sin inducir (Figura 15-A). En el ensayo de Western Blot se observa el reconocimiento bastante específico e intenso por parte del anticuerpo anti-His (Clontech) sobre una proteína presente en el homogeneizado de proteínas de bacterias inducidas, en comparación con las muestras sin inducir que no lo presentan (Figura 15-B).

La masa molecular de la enzima TcNTH1 fue obtenida desde de su secuencia aminoacídica derivada, mediante el programa ACBB (*Applied Computational Biology and Bioinformatics*), resultando ser de 28 kDa, lo cual coincide en el rango de masa molecular de la proteína observada en los ensayos realizados. A partir de estos datos, se seleccionó el clon bacteriano 3 para la purificación parcial de la proteína recombinante TcNTH1.

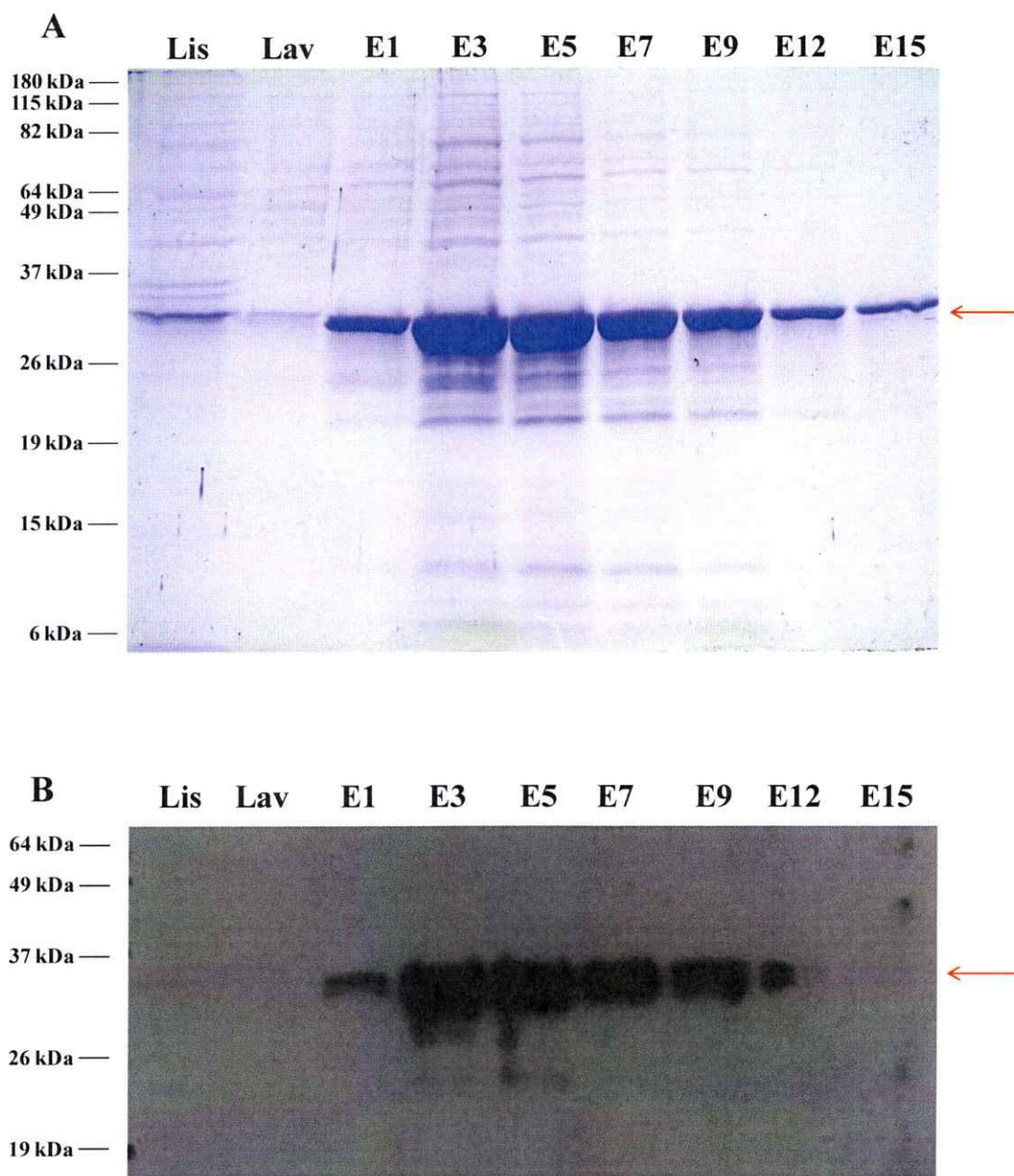


**Figura 15: Inducción de la expresión de la proteína TcNTH1 en *Escherichia coli* BL21 transformadas con la construcción pQE-80L-*tcnth1*.** Comparación de la expresión de TcNTH1 en homogeneizado de proteínas totales de 3 clones bacterianos transformados con la construcción pQE-80L-*tcnth1*. En la imagen **A** se observa un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. En la imagen **B** se muestra el Western Blot, utilizando como anticuerpo primario anti-His 1:4000 (v/v) (Clontech). En la parte superior de cada imagen se indican los clones bacterianos BL21 transformados, enumerados como **clon 1, 2 y 3**. Las muestras que fueron inducidas con 0,5mM de IPTG y las no inducidas con IPTG son representadas por los signos + y -, respectivamente. La flecha roja indica la proteína TcNTH1. Al costado izquierdo de cada imagen se indican las masas moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).

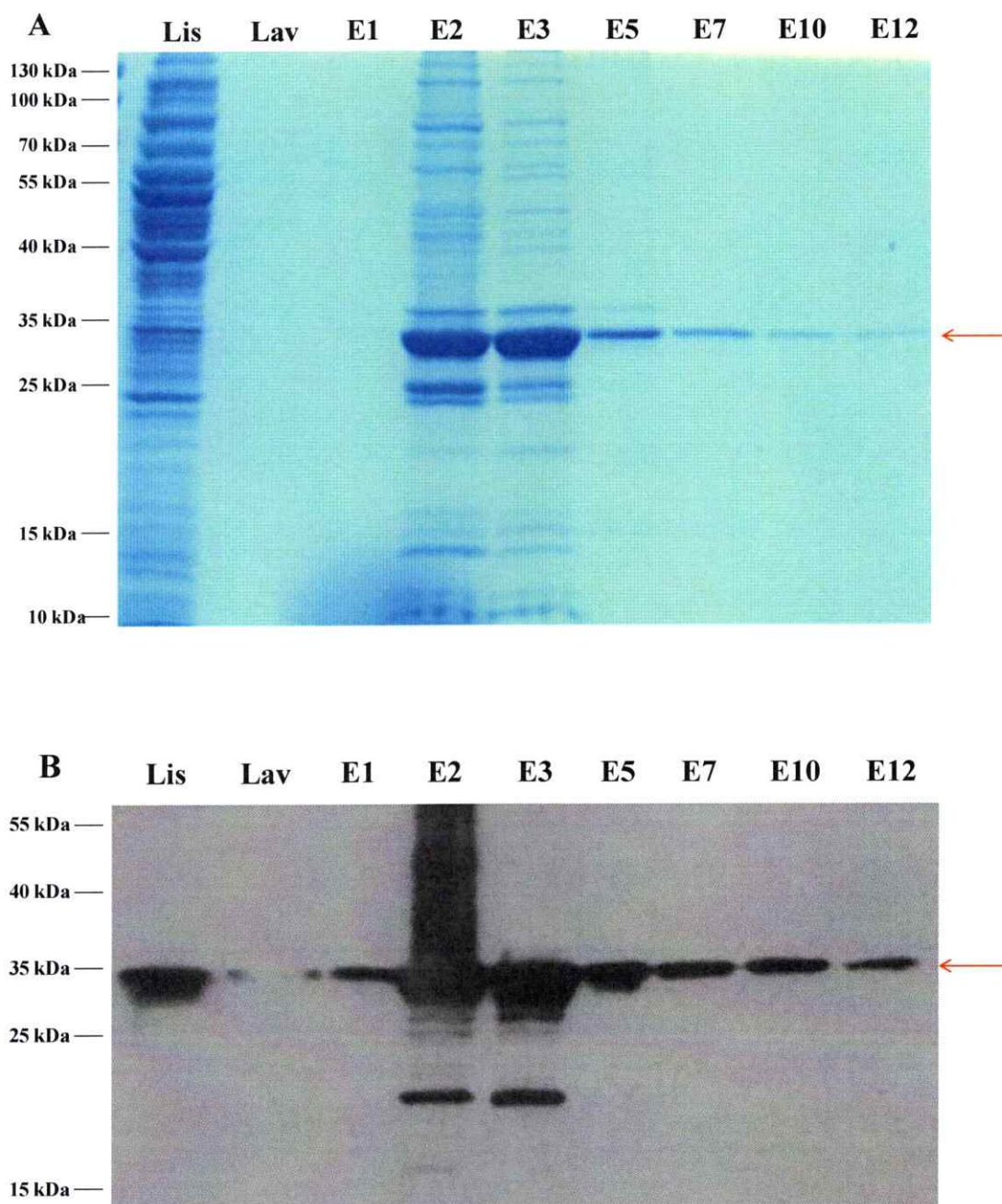
#### **4.4. Purificación parcial de la proteína TcNTH1 recombinante**

La proteína TcNTH1 recombinante fue purificada parcialmente mediante cromatografía de afinidad en condiciones denaturantes y nativas, a partir de un cultivo obtenido desde el clon 3 de bacteria transformada e inducida. La purificación parcial en condiciones denaturantes (6 M GnCl y 8 M Urea) fue utilizada para obtener grandes cantidades de proteína TcNTH1, con la finalidad de emplearla como antígeno para la inmunización de ratones y de esta manera generar anticuerpos policlonales. En cambio, la purificación parcial en condiciones nativas con imidazol fue utilizada para obtener la proteína funcional, con el fin de realizar ensayos de actividad enzimática.

Con las eluciones obtenidas de ambas purificaciones, se tomaron alícuotas para realizar un SDS-PAGE y un ensayo de Western Blot, para corroborar la presencia de la enzima (Figuras 16 y 17). De esta manera, se verificó que la proteína TcNTH1 se encuentra presente en mayor cantidad desde la elución E3 a la E9 en la purificación parcial en condición denaturante (Figura 16). En cambio, en la purificación parcial en condición nativa, la proteína TcNTH1 se encuentra en mayor cantidad en las eluciones E2 y E3 (Figura 17).



**Figura 16: Identificación de la proteína TcNTH1 recombinante purificada parcialmente en condiciones denaturantes.** **A:** SDS-PAGE en gel al 12%, las proteínas fueron teñidas con azul de *Coomassie*. **B:** Western-Blot, se utilizó como anticuerpo primario anti-His 1:4000 (v/v) (Clontech). En la parte superior de cada imagen se indican: pre-carga de lisado bacteriano (**Lis**), lavado de la columna (**Lav**) y eluciones colectadas (**E1** a **E15**). La flecha roja indica la proteína TcNTH1. Al costado izquierdo de cada imagen se indican las masas moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).

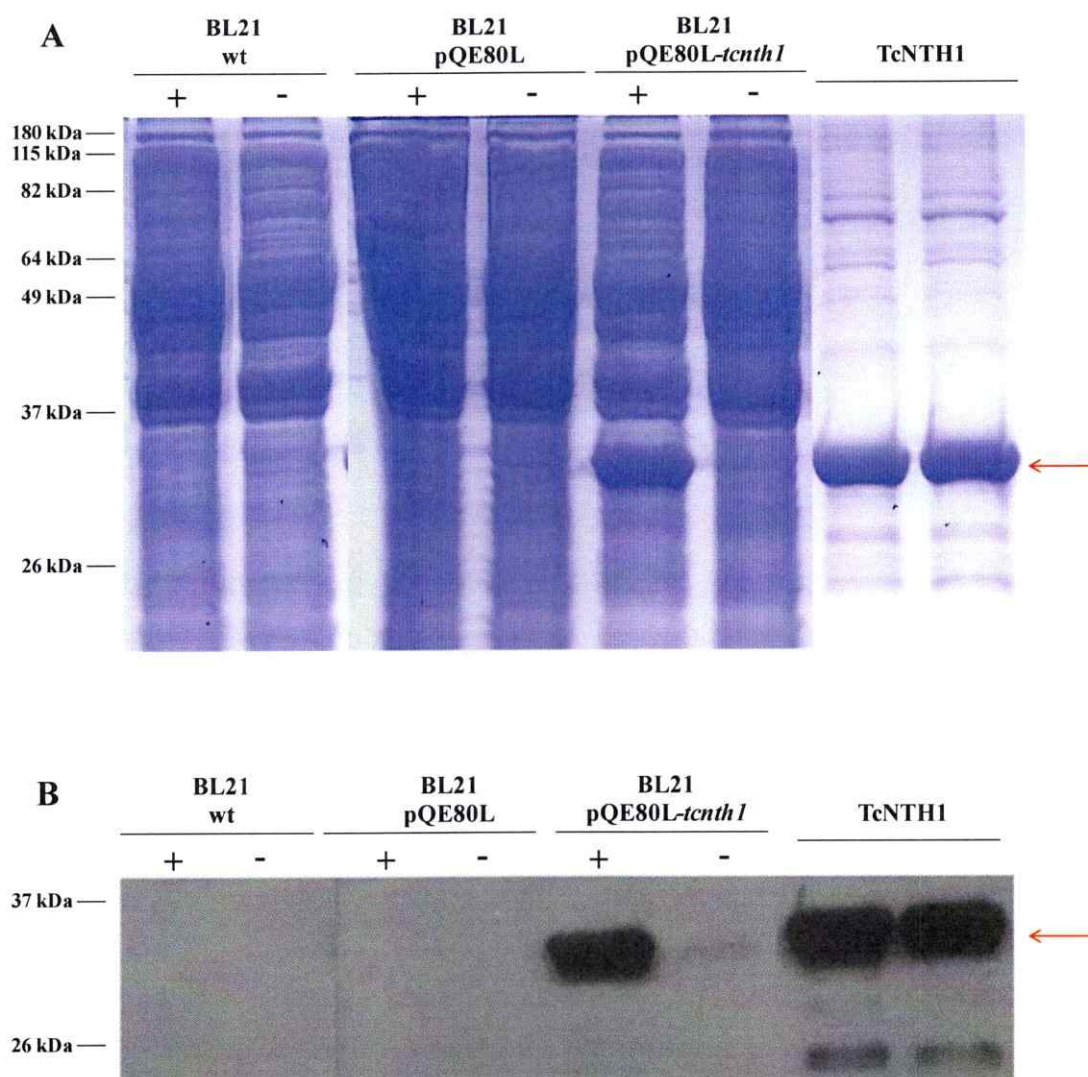


**Figura 17: Identificación de la proteína TcNTH1 recombinante purificada parcialmente en condiciones nativas.** **A:** SDS-PAGE en gel al 12%, las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. **B:** Western-Blot, se utilizó como anticuerpo primario anti-His 1:10000 (v/v) (Clontech). En la parte superior de cada imagen se indican: pre-carga de lisado bacteriano (**Lis**), lavado (**Lav**) y eluciones colectadas (**E1 a E12**). La flecha roja indica la proteína TcNTH1. Al costado izquierdo de cada imagen se indican las masas moleculares en kDa (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).

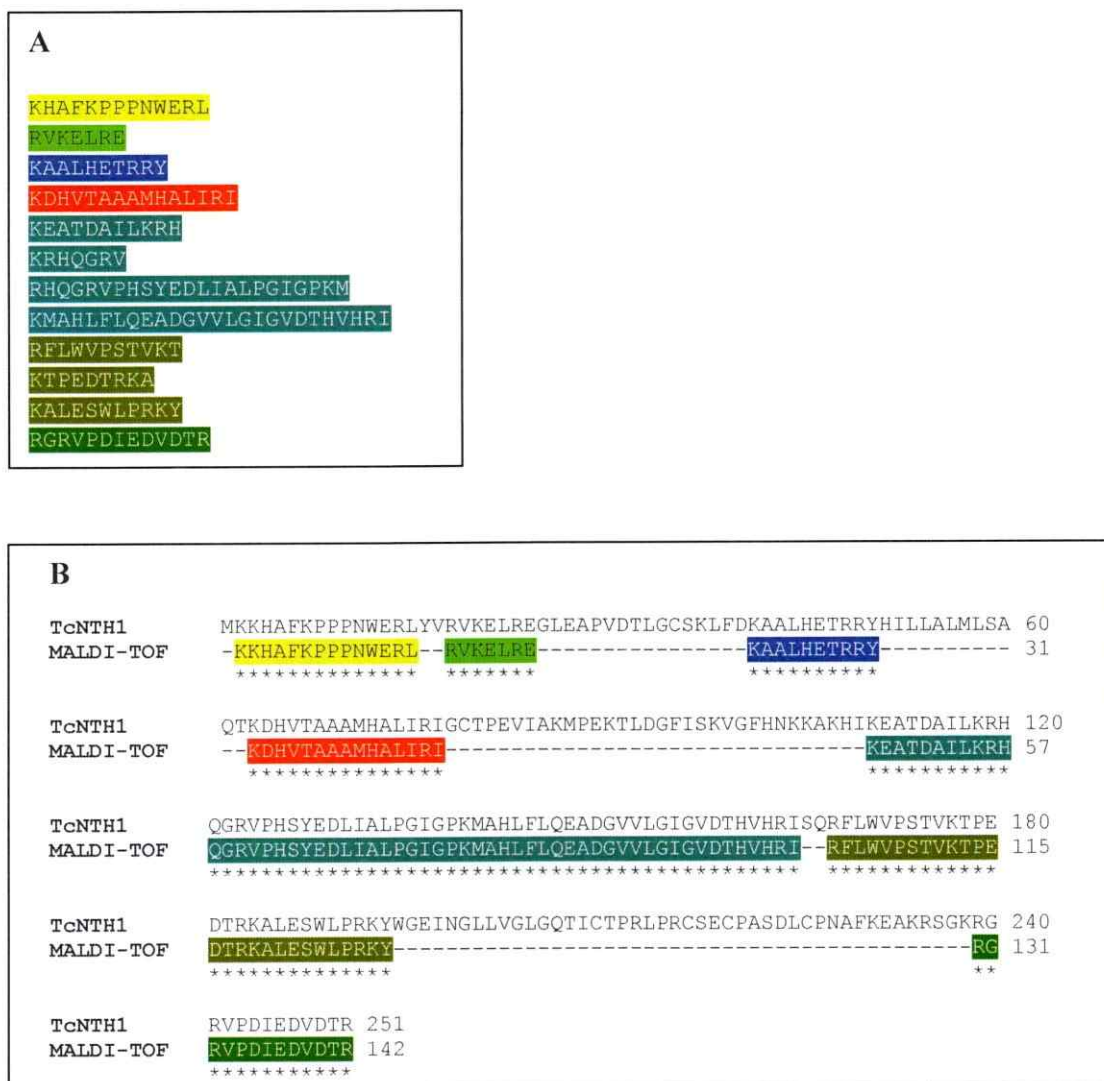


Por último, se realizó una electroforesis de proteínas con todos los controles necesarios para comparar con la TcNTH1 purificada parcialmente en condiciones denaturantes, con el fin de contrastar y verificar si efectivamente la banda reconocida en el Western Blot por el anticuerpo anti-His es la proteína TcNTH1 (Figura 18). Es destacable el hecho de que sólo existe reconocimiento por parte del anticuerpo en el lisado de *E. coli* BL21 pQE-80L-*tcnth1* inducida con IPTG y en la muestra de proteína TcNTH1 purificada parcialmente. Para el caso de *E. coli* BL21 pQE-80L-*tcnth1* sin inducir también es posible observar que el anticuerpo logra reconocer una banda, pero ésta es muy poco nítida, lo que podría estar dando cuenta de una expresión basal de TcNTH1 cuando las bacterias transformadas no son inducidas por IPTG.

Por medio de espectrometría de masa MALDI-TOF (laboratorio del Dr. Ulf Hellman, *Ludwig Institute for Cancer Research* de Uppsala, Suecia) se secuenció la banda correspondiente a la TcNTH1 purificada en condición denaturante (Figura 19). Las secuencias de los péptidos obtenidos por MALDI-TOF muestran una cobertura de 57% al ser alineados con la secuencia de la proteína TcNTH1 putativa disponible en la base de datos (NCBI, GenBank accession: ESS67492). Las secuencias obtenidas mediante MALDI-TOF no muestran variaciones de los residuos aminoacídicos con respecto a la secuencia putativa de TcNTH1 disponible en la base de datos, de lo cual se desprende que no hubo mutaciones que afectaran las regiones de la enzima que fueron secuenciadas. Se debe destacar que el motivo de secuencia HhH-GDP y los residuos catalíticos Lys140 y Asp159 están presentes de manera íntegra en la secuencia obtenida por MALDI-TOF.



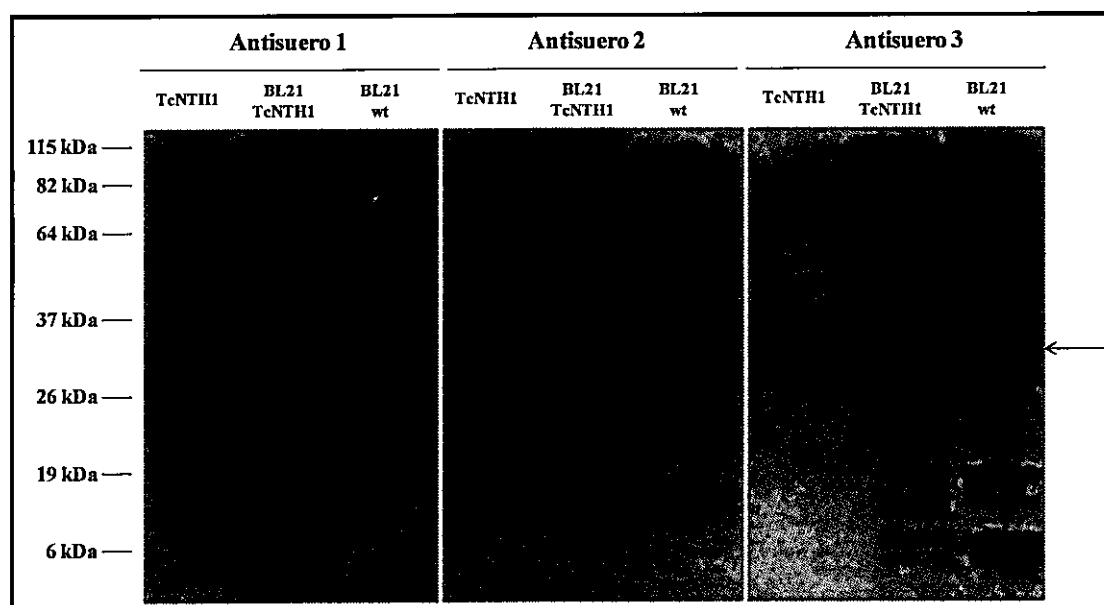
**Figura 18: Evaluación de la expresión de TcNTH1 recombinante en *E. coli* BL21.** Análisis de la expresión de TcNTH1 en homogeneizado de proteínas totales de *E. coli* BL21 *wild type* (BL21 wt), *E. coli* BL21 transformada con el vector sin el inserto (BL21 pQE80L), *E. coli* BL21 transformada con la construcción (BL21 pQE80L-*tcnH1*) y las fracciones colectadas de la proteína TcNTH1 purificada parcialmente en condiciones denaturantes, en donde se juntó desde la E1 a la E15 (TcNTH1). En la imagen **A** se observa un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. En la imagen **B** se muestra el Western Blot, utilizando como anticuerpo primario anti-His 1:4000 (v/v) (Clontech). Las muestras que fueron inducidas con 0,5mM de IPTG y las no inducidas con IPTG son representadas por los signos + y -, respectivamente. La flecha roja indica la proteína TcNTH1. Al costado izquierdo de cada imagen se indican las masas moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).



**Figura 19: Identificación de TcNTH1 recombinante mediante MALDI-TOF. A:** Secuencias de péptidos de la proteína TcNTH1 obtenidos a partir de la espectrometría de masas. La proteína fue sometida previamente a digestión enzimática con tripsina, una proteasa que hidroliza el enlace peptídico en el lado carboxilo de los aminoácidos Lys (K) o Arg (R). **B:** Alineamiento de péptidos obtenidos (MALDI-TOF) con la secuencia de la DNA glicosilasa NTH1 de *T. cruzi* Dm28c (NCBI, GenBank accession: ESS67492) (TcNTH1), utilizando el programa ClustalW2.

#### 4.5. Generación de anticuerpos policlonales anti-TcNTH1

Se inmunizaron 3 ratones (*Mus musculus* BALB/c) con la proteína TcNTH1 obtenida mediante purificación parcial en condiciones denaturantes, previamente dializada en Buffer PBS. Al cabo de 8 semanas, se obtuvieron los antisueros de los ratones y se evaluó su capacidad de reconocimiento de TcNTH1 en homogeneizados de proteínas totales de bacteria, mediante Western Blot (Figura 20).



**Figura 20: Evaluación de antisueros sanguíneos sobre lisados de bacteria.** Ensayo de Western Blot (gel 15%) para determinar la capacidad de reconocimiento de los antisueros sanguíneos (**Antisueros 1, 2 y 3**) sobre proteína recombinante (**TcNTH1**), *E. coli* BL21 que expresa TcNTH1 recombinante (**BL21 TcNTH1**) y *E. coli* BL21 wild type (**BL21 wt**). Se cargaron 50µg de homogeneizado de proteínas totales y se utilizó como anticuerpo primario los antisueros obtenidos de ratón en una dilución 1:5000 (v/v) en PBS-T<sub>BSA</sub> 1%. La flecha roja indica la proteína TcNTH1. Al costado izquierdo de la imagen se indican las masas moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).

Analizando los resultados, el antisuero 1 reconoce la proteína TcNTH1 recombinante, pero también presenta un notorio reconocimiento inespecífico de otras proteínas en la muestra de enzima purificada (TcNTH1). En el lisado de bacterias que expresan TcNTH1 (BL21 TcNTH1), el antisuero 1 reconoce la enzima TcNTH1, pero también se une de manera inespecífica a numerosas proteínas de otras masas moleculares. Para el caso del lisado de bacteria *wild type* (BL21 wt), se observa que el antisuero 1 no se une a las proteínas presentes, lo que era de esperar, ya que no se está expresando la enzima TcNTH1 en aquellas bacterias.

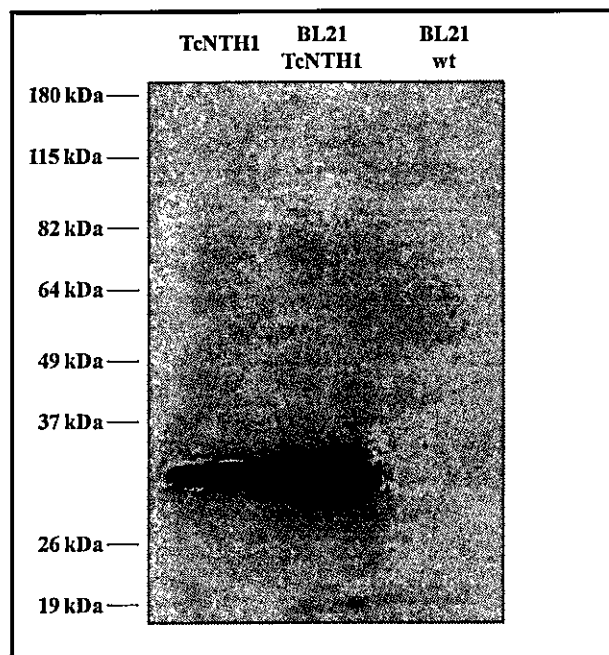
Por su parte, el antisuero 2 reconoce de forma bastante específica la proteína TcNTH1, tanto al ser incubado con la proteína purificada (TcNTH1) como al incubarse con *E. coli* que expresan TcNTH1 (BL21 TcNTH1). En este último caso, también se observa reconocimiento de una proteína de 6 a 19 kDa de masa molecular, lo que también se puede observar notoriamente en el antisuero 1. En el lisado de *E. coli wild type* (BL21 wt), también se presenta esta banda de 6 a 19 kDa, pero no está presente TcNTH1 como se esperaría, por ser bacterias que no poseen el gen que codifica la enzima TcNTH1.

Por último, si bien el antisuero 3 reconoce la proteína TcNTH1 purificada (TcNTH1), en los lisados de bacteria que expresa TcNTH1 (BL21 TcNTH1) y en bacteria *wild type* (BL21 wt), los anticuerpos del antisuero 3 se unen a numerosas proteínas de variada masa molecular, siendo el antisuero que presenta mayor reconocimiento inespecífico.

Con estos resultados se determinó que los mejores antisueros para continuar con los siguientes experimentos eran 1 y 2. Sin embargo, al evaluar los antisueros 1 y 2 en

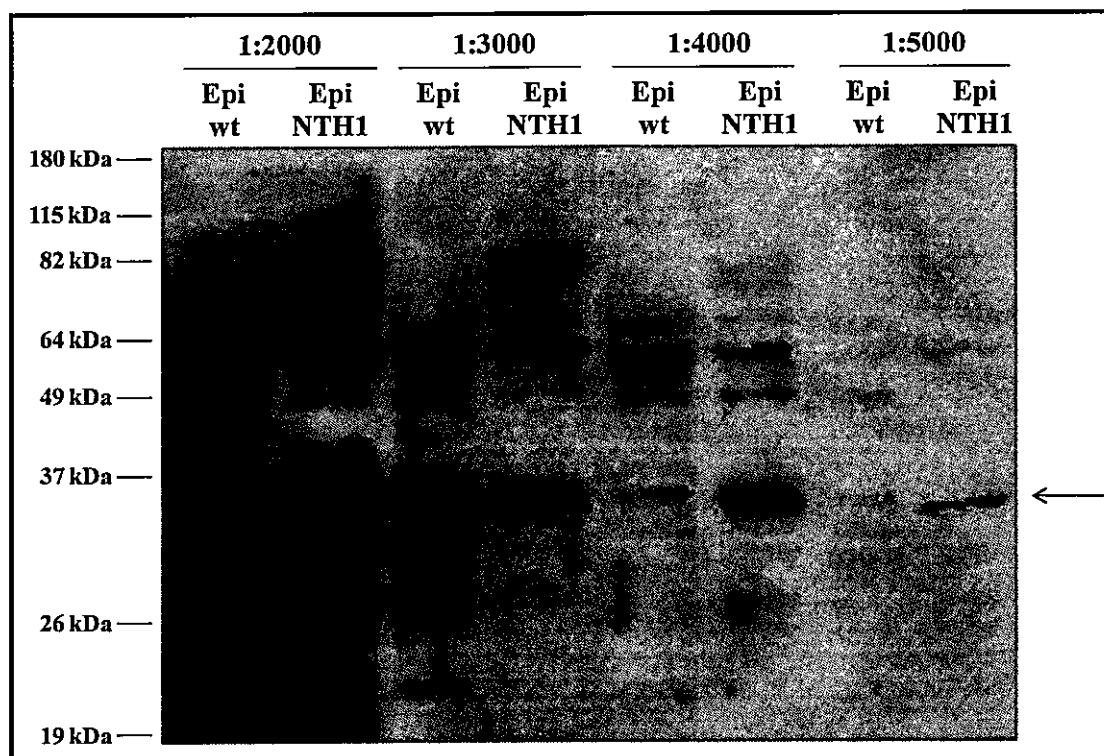
lisados de epimastigotes de *T. cruzi*, el resultado fue desfavorable para ambos antisueros, ya que ninguno reconoció la proteína TcNTH1 de manera específica en epimastigotes que sobreexpresan la enzima (resultados no mostrados).

Debido a ello, se evaluó la capacidad de reconocimiento de TcNTH1 por anticuerpos policlonales presentes en el líquido ascítico extraído desde la cavidad peritoneal del ratón 2 (Figura 21). El líquido ascítico presentó un reconocimiento altamente específico al ser comparado con los antisueros obtenidos, por lo que se optó por continuar los siguientes experimentos con este material.



**Figura 21: Evaluación de anticuerpos policlonales presentes sobre líquido ascítico en lisados de bacteria.** Ensayo de Western Blot (gel 12%) para determinar la capacidad de reconocimiento del líquido ascítico del ratón 2 sobre proteína recombinante (**TcNTH1**), *E. coli* BL21 que expresa TcNTH1 recombinante (**BL21 TcNTH1**) y *E. coli* BL21 *wild type* (**BL21 wt**). Se cargaron 20µg de homogeneizado de proteínas totales y se utilizó como anticuerpo primario el líquido ascítico obtenido del ratón 2 en una dilución 1:5000 (v/v) en PBS-T<sub>BSA</sub> 2%. Al costado izquierdo de la imagen se indican las masa moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).

El líquido ascítico fue titulado en homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes *T. cruzi* Dm28c, con la finalidad de determinar la dilución a la cual debía ser utilizado para ensayos posteriores de reconocimiento de TcNTH1. En la Figura 22 se observa que a medida que aumenta la dilución del anticuerpo (líquido ascítico), disminuye la intensidad del reconocimiento de la proteína TcNTH1, tanto en lisados de epimastigote *T. cruzi wild type* (Epi wt) como en lisados de epimastigote *T. cruzi* que sobreexpresa la enzima TcNTH1 (Epi NTH1). También a mayor dilución, el reconocimiento inespecífico de otras proteínas disminuye. Como era de esperar, el reconocimiento sobre la proteína TcNTH1 es mucho mayor en Epi NTH1 que en Epi wt, debido a que los primeros fueron transfectados con un vector que porta el gen que codifica para la proteína TcNTH1, por lo que este ensayo corrobora una mayor expresión de esta proteína en aquellos epimastigotes. Se determinó que la dilución idónea del líquido ascítico para el ensayos siguientes era 1:2000 (v/v), ya que la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos obtenidos sobre la proteína TcNTH1 en lisados de *T. cruzi wild type* (Epi wt) es baja y compleja de discernir.



**Figura 22:** Titulación de anticuerpos presentes en líquido ascítico sobre lisados de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* Dm28c. Ensayo de Western Blot (gel 15%) para determinar la dilución óptima de líquido ascítico. En la parte superior de la imagen se indica la dilución del anticuerpo primario (líquido ascítico) en PBS-T<sub>BSA 2%</sub> (1:2000, 1:3000, 1:4000 y 1:5000, todas las diluciones en (v/v)). Se cargaron 40µg de homogeneizado de proteínas totales de epimastigote *T. cruzi* wild type (Epi wt) y epimastigote *T. cruzi* que sobreexpresa la enzima TcNTH1 (Epi NTH1). La flecha roja indica la proteína TcNTH1. Al costado izquierdo de la imagen se indican las masas moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).

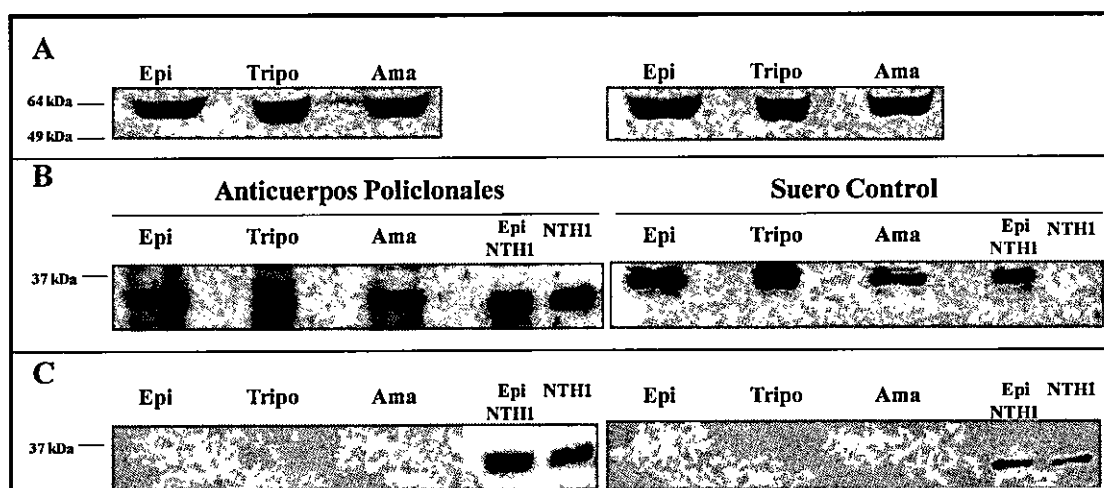


#### 4.6. Identificación de la enzima TcNTH1 en epimastigote, tripomastigote y amastigote de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c

Los anticuerpos policlonales generados (líquido ascítico) fueron utilizados para detectar la presencia y expresión de la proteína TcNTH1 en las diferentes formas celulares de *T. cruzi* cepa Dm28c, mediante ensayo de Western Blot. En la Figura 23 se observa que la proteína TcNTH1 se expresa en las tres formas celulares de *T. cruzi* Dm28c. Este resultado es comparado con el control negativo, en donde se utilizó como anticuerpo primario el suero de un ratón que no fue inmunizado con la proteína TcNTH1, observándose que no hay reconocimiento de TcNTH1 por parte del suero-control. Esto confirma que el líquido ascítico contiene anticuerpos policlonales generados por la inoculación del antígeno (TcNTH1) en el ratón. Como control positivo, se cargó lisado de epimastigote que sobreexpresa TcNTH1 (Epi NTH1) y proteína recombinante purificada (NTH1), verificándose que la proteína de interés es reconocida en estas muestras sólo por el líquido ascítico. Como control de carga de las tres formas celulares de *T. cruzi* cepa Dm28c, se utilizó el anticuerpo primario anti-tubulina, el cual reconoce la proteína  $\alpha$ -tubulina, una de las subunidades que constituyen los microtúbulos presentes en el citoesqueleto de las células eucariontes.

Finalmente, se realizó un *stripping* a las membranas de nitrocelulosa para retirar los anticuerpos policlonales e incubar con anticuerpo anti-His. Esto permitió corroborar que la proteína reconocida en los carriles Epi NTH1 y NTH1 por el líquido ascítico, es efectivamente la NTH1 de *T. cruzi*. Además se verifica que la TcNTH1 no es reconocida por el suero control.



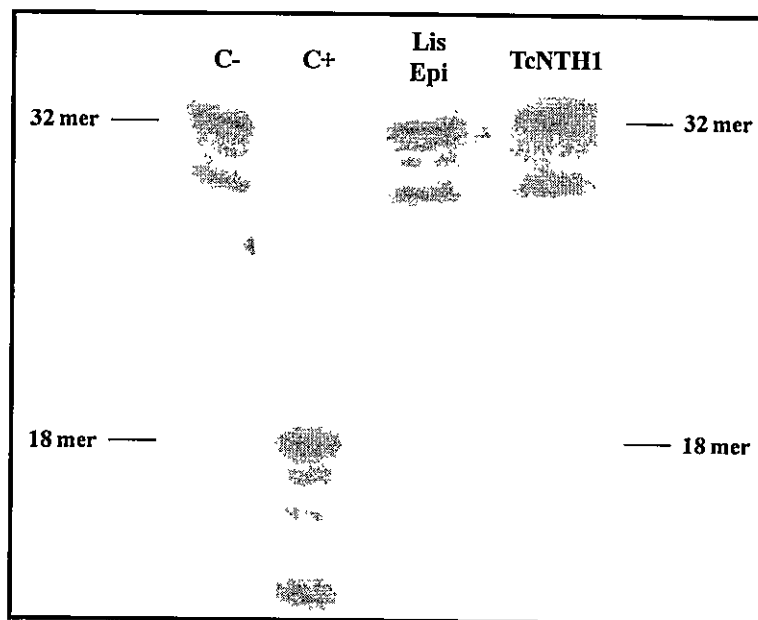


**Figura 23: Detección de la proteína TcNTH1 en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c.** Se cargaron 50µg de proteínas totales de homogeneizado de epimastigote (Epi), tripomastigote (Tripo), amastigote (Ama) y epimastigotes que sobreexpresan la proteína TcNTH1 (Epi NTH1). También se cargó la proteína recombinante (NTH1) **A:** Control de carga, utilizando como anticuerpo primario anti-tubulina 1:1000 (v/v) en PBS-T<sub>BSA 2%</sub>. **B:** Identificación de TcNTH1, utilizando como anticuerpo primario líquido ascítico (Anticuerpos Policlonales) o Suero Control a una dilución 1:2000 (v/v) en PBS-T<sub>BSA 2%</sub>. **C:** Confirmación mediante *stripping* de la detección de TcNTH1, utilizando como anticuerpo primario anti-His 1:10000 (v/v) (Clontech) en PBS-T<sub>BSA 2%</sub>. Al costado izquierdo de cada imagen se indican las masas moleculares en kDa (*BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*, Invitrogen).

#### 4.7. Ensayo de actividad enzimática de TcNTH1

La actividad enzimática de la proteína TcNTH1 fue evaluada mediante un ensayo de escisión de un oligonucleótido marcado que presenta una base oxidada o un sitio apurínico/apirimídico. La sonda con timina glicol (Tg) de 32 mer fue incubada con la enzima TcNTH1 purificada parcialmente en condiciones nativa (Figura 24). En este ensayo no se observó escisión en la muestra incubada con lisado de epimastigote que sobreexpresa NTH1 (Lis Epi), ni en la muestra incubada con TcNTH1 purificada parcialmente. En cambio, se aprecia una banda correspondiente al oligonucleótido

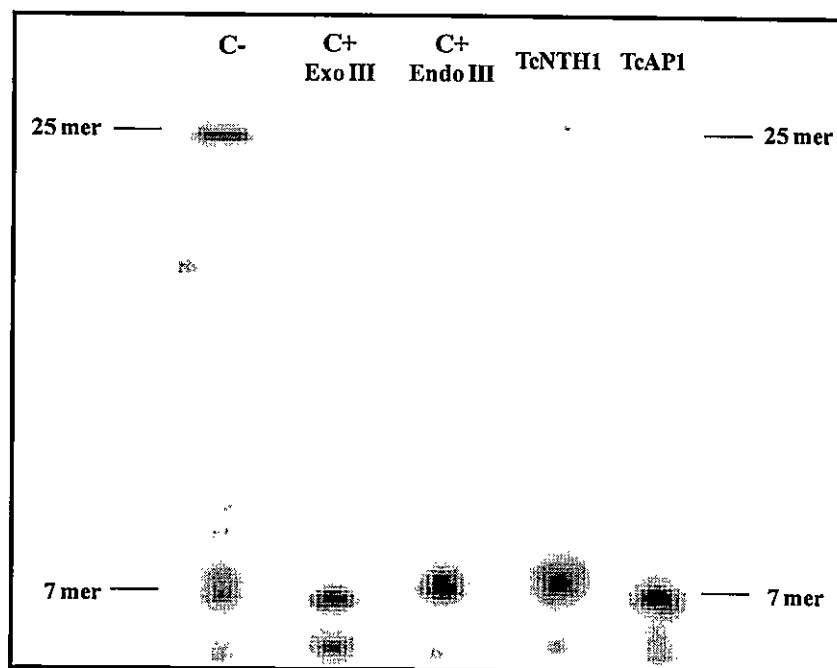
cortado por la actividad catalítica de la Endonucleasa III de *E. coli* de 211 aminoácidos (New England Biolabs) utilizada como control positivo.



**Figura 24: Evaluación de la bifuncionalidad de la enzima TcNTH1 sobre la sonda timina glicol.** Se estimó la actividad DNA glicosilasa y AP liasa de la enzima TcNTH1, sobre una sonda de DNA con una base oxidada (Tg). **C-:** control negativo, sonda Tg sin enzima, **C+:** control positivo, sonda Tg incubada con la enzima Endonucleasa III de *E. coli* de 211 aa (New England Biolabs), **Lis Epi:** sonda Tg incubada con 50 µg de proteínas de lisado de epimastigote *T. cruzi* que sobreexpresa NTH1, **TcNTH1:** sonda Tg incubada con 1 µg de enzima TcNTH1 purificada parcialmente de forma nativa (fracción colectada E2). En los costados de la imagen se señalan los tamaños del sustrato y producto de la reacción enzimática en *mer*.

Debido a que la enzima TcNTH1 no estaría presentando actividad AP liasa al ser incubada con una sonda Tg, se probó utilizar una sonda con uracilo de 25 mer. Esta sonda al ser previamente tratada con la enzima UDG de *E. coli* (New England Biolabs), genera un sitio AP. La sonda AP obtenida fue incubada con las enzimas TcNTH1 y TcAPI purificadas parcialmente en condiciones nativas. La enzima TcAPI, disponible en el laboratorio, es una AP endonucleasa de *T. cruzi* que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster en la posición 5' del sitio AP (Sepúlveda y col, 2014).

En la Figura 25, se observa que tanto la enzima TcNTH1 como la TcAP1 provocan la ruptura del oligonucleótido con el sitio AP. Al comparar con los controles positivos, se observa que TcNTH1 estaría generando un producto enzimático del mismo tamaño que el producto de la Endonucleasa III de *E. coli*. En cambio, TcAP1 estaría generando un producto catalítico del mismo tamaño que el producto de la Exonucleasa III de *E. coli* de 268 aminoácidos (New England Biolabs), una proteína ortóloga de la AP endonucleasa 1. También se aprecia cierta ruptura espontánea de la sonda AP en el control negativo, debido probablemente a la labilidad que se genera en el oligonucleótido por el sitio AP.



**Figura 25: Detección de actividad catalítica de la enzima TcNTH1 sobre una sonda AP (sitio abásico).** C-: control negativo, sonda AP sin enzima, C+ Exo III: control positivo, sonda AP incubada con la enzima exonucleasa III de *E. coli* de 268 aa (New England Biolabs), C+ Endo III: control positivo, sonda AP incubada con la enzima endonucleasa III de *E. coli* de 211 aa (New England Biolabs), TcNTH1: sonda incubada con 1 µg de enzima TcNTH1 purificada parcialmente de forma nativa (fracción colectada E2), TcAP1: sonda incubada con 1 µg de enzima AP endonucleasa 1 de *T. cruzi* purificada de forma nativa. En los costados de la imagen se señalan los tamaños del sustrato y producto de la reacción enzimática en mer.

Por lo tanto, la enzima TcNTH1 purificada parcialmente presenta actividad enzimática que podría corresponder a una actividad AP liasa, debido a que reconoce el sitio AP y provoca la ruptura de la hebra de DNA marcada. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de una actividad catalítica de tipo endonucleasa.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Identificación de la expresión de NTH1 en *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c

La endonucleasa III DNA glicosilasa 1 (NTH1) fue descubierta, purificada y caracterizada por primera vez a partir de *E. coli*, siendo relacionada en un comienzo a una actividad enzimática de tipo endonucleolítica (Radman, 1976). Posteriormente, se identificaron secuencias que presentaban regiones de homología con la NTH1 de *E. coli* en genomas de diversos organismos pertenecientes a los 3 dominios: Bacteria, Arquea y Eucaria (Eisen & Hanawalt, 1999).

Los primeros organismos eucariontes en los que se logró clonar la secuencia genética, identificar y caracterizar la proteína NTH1, fue en las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* (Roldán-Arjona y col., 1996) y *Saccharomyces cerevisiae* (Eide y col., 1996). Posteriormente, enzimas ortólogas de Endo III también fueron identificadas en *Caenorhabditis elegans* (Morinaga y col., 2009), bovino (Hilbert y col., 1996), ratón (Sarker y col., 1998), *Arabidopsis thaliana* (Roldán-Arjona, 2000) y humano (Aspinwall y col., 1997; Hilbert y col., 1997). Mediante inmunofluorescencia, se detectó en células HeLa S3 que la enzima HsNTH1 se encuentra distribuida en el núcleo y citoplasma. No obstante, en algunas células, la enzima se encontraba concentrada predominantemente en el núcleo (Ikeda y col., 1998). La presencia en el citoplasma se explica por un gen del DNA mitocondrial que codifica una proteína con

secuencias homólogas a Endo III, la que está asociada a la reparación del mtDNA. Esta enzima fue reportada y caracterizada en células hepáticas de rata (Stierum y col., 1999).

En Tripanosomátidos se han descubierto secuencias que codifican para proteínas ortólogas de Endo III en los genomas en *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* (Genois y col., 2014).

Con el fin de identificar la expresión de NTH1 en las diferentes formas celulares de *T. cruzi* Dm28c, se generaron anticuerpos policlonales. Los antisueros obtenidos no reconocieron la enzima TcNTH1, resultado que sugiere que ésta podría no representar un estímulo inmunogénico suficiente para la producción de anticuerpos policlonales en el ratón. Por otra parte, el líquido ascítico generado en uno de los ratones reconoció una proteína de masa molecular similar a TcNTH1, sugiriendo que ese ratón pudo haber desarrollado una respuesta inmune más robusta que los otros ratones.

Con el líquido ascítico obtenido se identificó la expresión de la enzima TcNTH1 en homogeneizados de proteínas totales de epimastigote, tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* cepa Dm28c, mediante ensayo de Western Blot. Se comprobó que la enzima TcNTH1 presenta una masa molecular cercana a los 37 kDa, coincidente con el rango de masa estimada para NTH1 ortóloga de otros organismos: 27 kDa en *E. coli*, 31 kDa en bovino, 36 kDa en Humano, 36 kDa en *C. elegans*, 37 kDa en mitocondria de células de rata, 43 kDa en *A. thaliana* y 43 kDa en *S. pombe* (Asahara y col., 1989; Hilbert y col., 1995; Roldán-Arjona y col., 1996; Aspinwall y col., 1997; Ikeda y col., 1998; Stierum y col., 1999; Roldán-Arjona y col., 2000; Morinaga y col., 2009).

La identificación de TcNTH1 en las tres formas celulares de *T. cruzi*, da cuenta de una expresión probablemente constitutiva, sugiriendo actividad catalítica de esta enzima

en todo el ciclo de vida del parásito. Este resultado es acorde a que las tres formas celulares de *T. cruzi* están sometidas a ROS/RNS, tanto generadas espontáneamente en el parásito como por respuesta defensiva de sus hospederos (Piacenza y col, 2009; Cabrera y col, 2011; Piacenza y col, 2013; Sepúlveda y col, 2014).

En trabajos futuros, los anticuerpos policlonales obtenidos podrán purificarse para su posterior uso en ensayos de localización subcelular de TcNTH1 mediante inmunofluorescencia, y en la determinación de un posible aumento de la expresión de TcNTH1 en *T. cruzi* sometido a estrés oxidativo.

## **5.2. Actividad enzimática de NTH1 de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c**

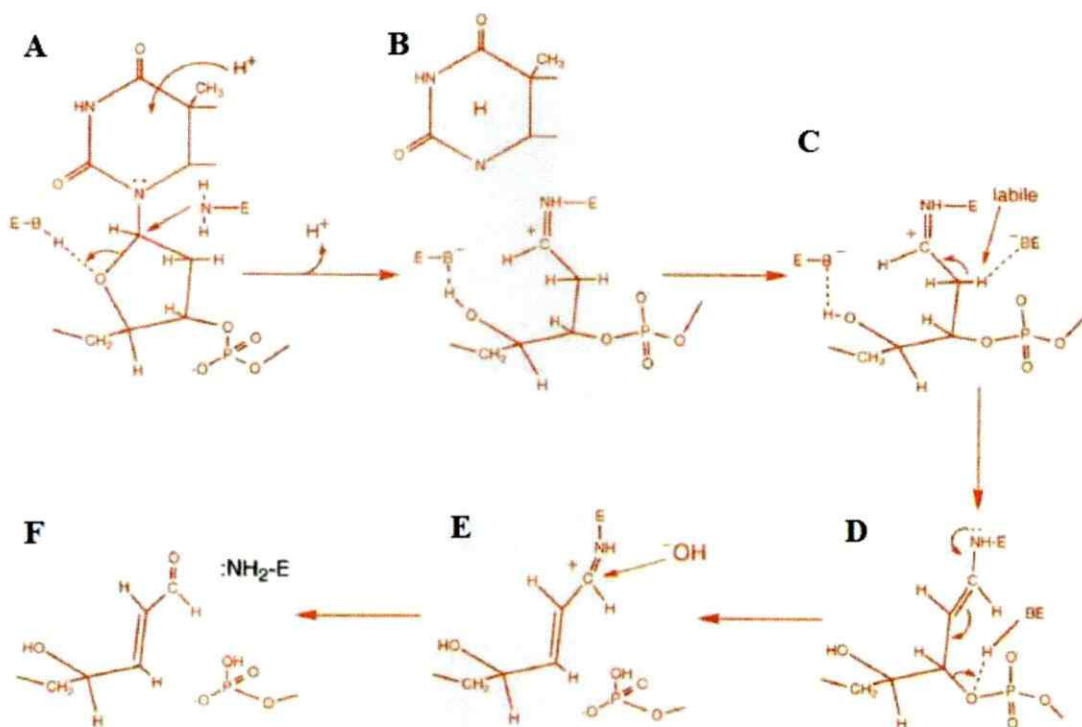
La NTH1 de *E. coli* fue asociada en un principio a una actividad de tipo endonucleasa, por su capacidad de escindir el DNA dañado por radiación UV, siendo denominada como Endonucleasa III (Radman, 1976). Sin embargo, posteriormente se descubrió que la Endo III de *E. coli* no escinde el DNA mediante hidrólisis del enlace fosfodiéster, como lo realizan las endonucleasas, sino que lo hace por medio de un mecanismo de  $\beta$ -eliminación que genera un producto que no es reconocido por la DNA polimerasa (Bailly & Verly, 1987).

Actualmente se sabe que la NTH1 de *E. coli* es una enzima bifuncional que presenta actividad DNA glicosilasa y AP liasa, capaz de reconocer y eliminar una amplia variedad de derivados oxidados de pirimidinas, para luego generar por  $\beta$ -eliminación un producto enzimático 3'  $\alpha,\beta$ -aldehído insaturado (Bailly & Verly, 1987; Kow & Wallace,



1987; Mazumder y col, 1991; Dodson y col., 1994; McCullough y col., 2001; Fromme y col., 2004). El mecanismo de acción enzimática propuesto involucra en primer lugar un ataque nucleofílico de una amina (residuo de lisina) al C1' de la ribosa asociada a la base dañada, provocando la escisión del enlace N-glucosídico y formando un intermediario imino o base de Schiff, la que aumenta la labilidad del sitioapurino/apirimídico recién creado. El progreso de la reacción continúa con la rotación del enlace C2'-C3' del intermediario, producto de esta labilidad, que deriva en la  $\beta$ -lisis del enlace 3' que une la ribosa con la hebra de DNA, lo que conlleva la disociación del intermediario y la formación de un *trans*- $\alpha,\beta$ -aldehído insaturado (Figura 26) (Dodson y col., 1994; Sun y col., 1995; McCullough y col., 1999; McCullough y col., 2001; Fromme y col., 2004).

La actividad enzimática de la proteína TcNTH1 purificada parcialmente fue evaluada con una sonda marcada con radiactividad que presenta una base timina glicol (Tg) apareada con adenina. En caso de tratarse de una enzima bifuncional, la TcNTH1 catalizaría la eliminación de Tg y cortarían la hebra de DNA, generando un producto de menor tamaño que el sustrato. No obstante, la enzima TcNTH1 no generó un producto cortado, ni tampoco se observó actividad catalítica en el lisado de epimastigotes que sobreexpresan esta enzima.



**Figura 26: Mecanismo enzimático de la proteína NTH1.** **A:** reconocimiento de base dañada y unión de la enzima al sustrato, **B:** eliminación de la base alterada y generación del intermediario imina, **C:** unión de otro residuo al intermediario y aumento de la labilidad del sitio básico, **D:** giro del intermediario, **E:**  $\beta$ -lisis del enlace 3' inducida por la enzima, **F:** separación de la enzima del DNA y generación del  $\alpha,\beta$ -aldehído insaturado (Imagen modificada de Dodson y col., 1994).

Las enzimas NTH1 que han sido caracterizadas en otros organismos, como *S. pombe*, *C. elegans*, *M. musculus*, *H. sapiens*, y la NTH1 de mitocondria de rata, presentan una mayor reactividad enzimática frente a oligonucleótidos que contienen una base modificada Tg, en contraste con los otros derivados oxidados pirimídicos (Hilbert y col., 1997; Ikeda y col., 1998; Sarker y col., 1998; Stierum y col., 1999; Yonekura y col., 2007; Morinaga y col., 2009). Además se ha reportado que la enzima NTH1 humana presenta mayor especificidad catalítica frente a oligonucleótidos Tg apareados con adenina (Marenstein y col., 2003), al igual que la sonda utilizada en el ensayo de

actividad enzimática presentado en este trabajo. En *C. elegans*, la NTH1 también cataliza con mayor eficiencia sondas con Tg apareada con adenina (Morinaga y col., 2009).

Hasta este punto, se supuso que NTH1 de *T. cruzi* sería una enzima monofuncional que eliminaría sólo la base oxidada, siendo incapaz de escindir el sitio AP generado. Esta opción pareció ser la más plausible, aunque la evidencia de la actividad catalítica de todas las NTH1 caracterizadas, desde *E. coli* hasta *H. sapiens*, demuestra que la NTH1 es una enzima bifuncional, determinándose la actividad AP liasa por escisión del enlace 3' mediante  $\beta$ -eliminación en NTH1 de *E. coli*, *M. musculus* y *H. sapiens* (Bailly & Verly, 1987; Aspinwall y col., 1997; Ikeda y col., 1998; Sarker y col., 1998; Marenstein y col., 2003). En la NTH1 de mitocondria de rata también se demostró y caracterizó la actividad AP liasa (Stierum y col., 1999).

Por este motivo, se evaluó la capacidad de escisión de un oligonucleótido con sitio AP por parte de TcNTH1. Los controles utilizados en el ensayo fueron Endo III de *E. coli*, la que está caracterizada como una enzima bifuncional que realiza  $\beta$ -eliminación, y la AP endonucleasa I de *T. cruzi* (TcAP1), una endonucleasa con actividad hidrolítica sobre el enlace fosfodiéster que genera un extremo 3' OH en oligonucleótidos con sitio AP (Sepúlveda y col., 2014). El producto obtenido de la reacción enzimática de TcNTH1 presentaría un tamaño mayor al producto generado por TcAP1 y equivalente al producto de Endo III. Esto que sugiere que la enzima TcNTH1 presenta actividad AP liasa, sin descartar la posibilidad de tratarse de actividad endonucleasa. Esto se debe a que la resolución del gel de acrilamida del ensayo realizado, no es suficiente para

discernir claramente si el producto generado por TcNTH1 presenta un extremo 3'- $\alpha,\beta$ -aldehído insaturado o 3'-OH.

El motivo por el cual la proteína no elimina la base oxidada timina glicol no se debería a una alteración de los aminoácidos participantes de la actividad catalítica ni del motivo HhH, ya que la secuencia aminoacídica de aquellas regiones, obtenidas por medio de MALDI-TOF no presentan mutaciones al ser comparadas con la secuencia de NTH1 de *T. cruzi* Dm28c disponible en la base de datos. Al comparar y analizar la secuencia de TcNTH1 con la NTH1 de humano y de la bacteria *B. stearothermophilus*, se determinó que los residuos aminoacídicos que participan en la catálisis y unión al DNA se encuentran bastante conservados. Además el modelamiento por homología de TcNTH1 no presentó diferencias estructurales significativas con respecto a la estructura de la NTH1 de *B. stearothermophilus*, la estructura molde. Tampoco presentó diferencias importantes con respecto a la NTH1 de humano en términos estructurales en las regiones modeladas de la proteína, aunque sus secuencias aminoacídicas difieren significativamente en el extremo amino terminal, región no modelada en la NTH1 de humano. La HsNTH1 presenta un mayor número de aminoácidos en aquella región y una señal de localización nuclear bipartita que no presenta TcNTH1. Era de esperar que la proteína BsNTH1 no presentara esta señal debido a que se trata de la enzima de un organismo procarionte, pero no es posible explicar la ausencia de la señal de localización nuclear bipartita en la región N-terminal de TcNTH1.

Aparentemente, la enzima TcNTH1 no reconocería la base Tg; para demostrar esta propuesta, se requeriría de un ensayo de captura del sustrato. Este ensayo consiste en incubar con tetrahidruroborato de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), un agente reductor, durante la

reacción enzimática.  $\text{NaBH}_4$  establece un enlace covalente entre la enzima y el sustrato, lo cual permite verificar mediante electroforesis la unión entre ambos componentes (Dodson y col., 1994). Mediante este ensayo, se corroboró la unión de NTH1 de *C. elegans* y *H. sapiens* a Tg (Morinaga y col., 2009; Hilbert y col., 1997).

Finalmente, se ha reportado que el 1% de las timinas del genoma nuclear de Tripanosomátidos son reemplazadas por la base modificada beta-d-glucosil-hidroximetiluracil (Base J); sin embargo, no se reportó actividad enzimática de reparación de esta base ni en lisados de *Trypanosoma brucei* ni por parte de DNA glicosilasas de otros organismos (Ulbert y col., 2004). Este hecho podría dar cuenta de la tolerancia a ciertas modificaciones en el DNA por parte los Tripanosomátidos, entre las que se podría incluir la timina glicol.

En definitiva, la TcNTH1 no elimina la base oxidada Tg. Nuestros resultados sugieren que esta enzima presenta actividad AP liasa, la que podría ser llevada a cabo mediante  $\beta$ -eliminación. No obstante, no es posible descartar una actividad endonucleasa canónica. Estos resultados constituyen los primeros antecedentes para la realización de una posterior caracterización enzimática que considere la variación de diferentes factores, tales como pH, temperatura y fuerza iónica, en la actividad de la enzima NTH1 de *T. cruzi*.

## 6. CONCLUSIONES

En este Seminario de Título se determinó que la enzima TcNTH1 es expresada en las tres formas celulares de *Trypanosoma cruzi*: epimastigote, tripomastigote y amastigote. Por otra parte, el derivado pirimídico timina glicol no constituye un blanco catalítico para la actividad DNA glicosilasa de la NTH1 de *T. cruzi*, siendo la única enzima del grupo de las DNA glicosilasa/AP liasa NTH1 reportadas que no elimina esta base oxidada. Pese a ello, la enzima TcNTH1 reconoce y escinde el sitio AP probablemente mediante  $\beta$ -eliminación, por lo que presentaría actividad AP liasa.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ACBB.

<http://bioinformatics.picr.man.ac.uk/research/software/tools/sequenceconverter.html>

Amino, R.; Martins, R.M.; Procopio, J.; Hirata, I.Y.; Juliano, M.A. y Schenkman, S. 2002. *J. Biol. Chem.* **277**: 6207-6213.

Andrews, N.W. 1993. *Biol.* **26**: 65-67.

Apt, W. y Zulantay, I. 2011. *Rev. Med. Chil.* **139**: 247-257.

Asahara, H.; Wistort, P.M.; Bank, J.F.; Bakerian, R.H. y Cunningham, R.P. 1989. *Biochem.* **28**: 4444-4449.

Aspinwall, R.; Rothwell, D.G.; Roldan-Arjona, T.; Anselmino, C.; Ward, C.J.; Cheadle, J.P.; Sampson, J.R.; Lindahl, T.; Harris, P.C. y Hickson, I.D. 1997. *PNAS* **94**: 109-114.

Bailly, V. y Verly, W.G. 1987. *Biochem. J.* **242**: 565-572.

Cabrera, G.; Barría, C.; Fernández, C.; Sepúlveda, S.; Valenzuela, L.; Kemmerling, U. y Galanti, N. 2011. *J. Cell. Biochem.* **112**: 2189-2199.

CDD. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>

Chagas, C. 1909. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1**: 159-218.

ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Coura, J.R. y de Castro, S.L. 2002. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 3-24.

CSA. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>

Daniels, J.P.; Gull, K. y Wickstead, B. 2010. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 552-569.

David, S.S.; O'Shea, V.L. y Kundu, S. 2007. *Nature* **447**: 941-950.

De Souza, W. 2002. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 269-285.

De Souza, W.; Attias, M. y Rodrigues, J.C.F. 2009. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 2069-2080.



- Demple, B. y Harrison, L. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 915-948.
- Dizdaroglu, M. 2005. *Mutat. Res.* **591**: 45-59.
- Dodson, M.L.; Michaelis, M.L. y Lloyd R.S. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**: 32709-32712.
- Donelson, J.E. y Zeng, W. 1990. *Parasit. Tod.* **6**: 327-334.
- Eide, L.; Bjørås, M.; Pirovano, M.; Alseth, I.; Berdal, K.G. y Seeberg, E. 1996. *PNAS* **93**: 10735-10740.
- Eisen, J.A. y Hanawalt, P.C. 1999. *Mutat. Res.* **435**: 171-213.
- Elias, M.C.; Nardelli, S.C. y Schenkman, S. 2009. *Fut. Microbiol.* **8**: 1065-1074.
- ENA. <http://www.ebi.ac.uk/ena/>
- Fárez-Vidal, M.E.; Gallego, C.; Ruiz-Pérez, L.M. y González-Pacanowska, D. 2001. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1549-1555.
- Flohé, L. 2012. *Int. J. Med. Microbiol.* **302**: 216-220.
- Fortini, P.; Parlanti, E.; Sidorkina, O.M.; Laval, J. y Dogliotti, E. 1999. *J. Biol. Chem.* **274**: 15230-15236.
- Fpocket. <http://fpocket.sourceforge.net/>
- Fromme, J.C.; Banerjee, A. y Verdine, G.L. 2004. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 43-49.
- Fromme, J.C. y Verdine, G.L. 2003. *EMBO J.* **22**: 3461-3471.
- Furnham, N.; Holliday, G.L.; de Beer, T.A.; Jacobsen, J.O.; Pearson, W.R. y Thornton, J.M. 2014. *Nucleic Acids Res.* **42**: 485-489.
- Furtado, C.; Kunrath-Lima, M.; Rajão, M.A.; Mendes, I.C.; de Moura, M.B.; Campos, P.C.; Macedo, A.M.; Franco, G.R.; Pena, S.D.J.; Teixeira, S.M.R.; Van Houten, B. y Machado, C.R. 2012. *PLoS One* **7**: e42484.
- Galanti, N.; Galindo, M.; Sabaj, V.; Espinoza, I. y Toro, G.C. 1998. *Parasit. Tod.* **14**: 64-70.
- Genois, M.M.; Paquet, E.R.; Laffitte, M.C.N.; Maity, R.; Rodrigue, A.; Ouellette, M. y Masson, J.Y. 2014. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**: 40-73.



- Gonzales-Perdomo, M.; Romero, P. y Goldenberg, S.; 1988. *Exp. Parasitol.* **66**: 205-212.
- Gourbière, S.; Dorn, P.; Tripet, F. y Dumonteil, E. 2012. *Heredity* **108**: 190-202.
- Graça-Souza, A.V.; Maya-Monteiro, C.; Paiva-Silva, G.O.; Braz, G.R.C.; Paes, M.C.; Sorgine, M.H.F.; Oliveira, M.F. y Oliveira, P.L. 2006. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 322-335.
- Grisard, E.C.; Texeira, S.M.R.; Almeida, L.G.P.; Stoco, P.H.; Gerber, A.L.; Talavera-López, C.; Lima, O.C.; Andersson, B. y de Vasconcelos, A.T.R. 2014. *Genome Announc.* **2**: 1114-1113.
- Guedes, P.; Fietto, J.; Lana, M. y Bahia, M. 2006. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* **5**: 175-186.
- Hazra, T.K.; Das, A.; Das, S.; Choudhury, S.; Kow, Y.W. y Roy, R. 2007. *DNA Repair.* **6**: 470-480.
- Hilbert, T.P.; Boorstein, R.J.; Kung, H.C.; Bolton, P.H.; Xing, D.; Cunningham, R.P. y Teebor, G.W. 1996. *Biochem.* **35**: 2505-2511.
- Hitomi, K.; Iwai, S. y Tainer, J.A. 2007. *DNA Repair.* **6**: 410-428.
- Huffman, J.L.; Sundheim, O. y Tainer, J.A. 2005. *Mutat. Res.* **577**: 55-76.
- Ide, H. y Kotera, M. 2004. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 480-485.
- Ikeda, S.; Biswas, T.; Roy, R.; Izumi, T.; Boldogh, I.; Sarker, A.H.; Seki, S.; Mitra, S. *Chem JB.* 1998. *J. Biol.Chem.* **273**: 21585-21593.
- Jockers-Scherubl, M.C.; Schirmer, R.H. y Krauth-Siegel, R.L. 1989. *Eur. J. Biochem.* **180**: 267-272.
- Kao, J.Y.; Goljer, I.; Phan, T.A.; Bolton, P.H. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**: 17787-17793.
- Karlin, S. y Ladunga, I. 1994. *PNAS* **91**: 12832-12836.
- Kelley, L.A. y Sternberg, M.J.E. 2009. *Nature Protocols.* **4**: 363-371.
- Kow, Y.W. y Wallace, S.S. 1987. *Biochem.* **26**: 8200-8206.
- Krauth-Siegel, R.L.; Enders, B.; Henderson, G.B.; Fairlamb, A.H. y Schirmer, R.H. 1987. *Eur. J. Biochem.* **164**: 123-128.

- Krokan, H.; Standal, R. y Slupphaug, G. 1997. *Biochem. J.* **16**: 1-16.
- Le Guilloux, V.; Schmidtke, P. y Tuffery, P. 2009. *BMC Bioinform.* **10**: 168.
- Lescure, F.X.; Le Loup, G.; Freilij, H.; Develoux, M.; Paris, L.; Brutus, L. y Pialoux, G. 2010. *Lancet Infect. Dis.* **10**: 556-570.
- Marchler-Bauer, A.; Zheng, C.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Lanczycki, C.J.; Lu, F.; Lu, S.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; Thanki, N.; Yamashita, R.A.; Zhang, D. y Bryant, S.H. 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**: 348-352.
- Marenstein, D.R.; Chan, M.K.; Altamirano, A.; Basu, A.K.; Boorstein, R.J.; Cunningham, R.P. y Teebor, G.W. 2003. *J. Biol. Chem.* **278**: 9005-9012.
- Marnett, L.J. 2000. *Carcinogenesis* **21**: 361-370.
- Maya, J.D.; Repetto, Y.; Agosin, M.; Ojeda, J.M.; Tellez, R.; Gaule, C. y Morello, A. 1997. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**: 101-106.
- Mazumder, A.; Gerlt, J.A.; Absalon, M.J.; Stubbe, J.; Cunningham, R.P.; Withka, J. y Bolton, P.H. 1991. *Biochem.* **30**: 1119-1126.
- Mccullough, A.K.; Dodson, M.L. y Lloyd, R.S. 1999. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 255-285.
- McCullough, A.K.; Sanchez, A.; Dodson, M.L.; Marapaka, P.; Taylor, J.S. y Lloyd, R.S. 2001. *Biochem.* **40**: 561-568.
- MINSAL. 2012.  
[http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/EnfChagas/Chagas\\_sem252012.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/EnfChagas/Chagas_sem252012.pdf)
- Morinaga, H.; Yonekura, S.I.; Nakamura, N.; Sugiyama, H.; Yonei, S. y Zhang-Akiyama, Q.M. 2009. *DNA Repair.* **8**: 844-851.
- NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Passos-Silva, D.G.; Rajão, M.A.; de Aguiar, P.H.N.; Vieira-da-Rocha, J.P.; Machado, C.R. y Furtado, C. 2010. *J. Nucleic Acids* **2010**: 840768.
- PDB. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- Peña-Díaz, J.; Akbari, M.; Sundheim, O.; Farez-Vidal, M.E.; Andersen, S.; Sneve, R.; Gonzalez-Pacanowska, D.; Krokan, H.E. y Slupphaug, G. 2004. *J. Mol. Biol.* **17**: 787-799.

- Phyre V 2.0. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>
- Piacenza, L.; Alvarez, M.N.; Peluffo, G. y Radi, R. 2009. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 415-421.
- Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M.N.; Martínez, A. y Radi, R. 2013. *Antioxid. Redox Signal.* **19**: 723-734.
- Radman, M. 1976. *J. Biol. Chem.* **251**: 1438-1445.
- Rassi, A.Jr.; Rassi, A. y Marin-Neto J.A. 2010. *Lancet.* **375**: 1388-1402.
- Rodriguez, A.; Samoff, E.; Rioult, M.G.; Chung, A. y Andrews, N.W. 1996. *J. Cell Biol.* **134**: 349-362
- Roldán-Arjona, T.; Anselmino, C. y Lindahl, T. 1996. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3307-3312.
- Roldán-Arjona, T.; García-Ortiz, M.V.; Ruiz-Rubio, M. y Ariza, R.R. 2000 *Plant Mol. Biol.* **44**: 43-52.
- Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L.A.; Ünsal-Kaçmaz, K. y Linn, S. 2004. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 39-85.
- Sarker, A.H.; Ikeda, S.; Nakano, H.; Terato, H.; Ide, H.; Imai, K.; Akiyama, K.; Tsutsui, K.; Bo, Z.; Kubo, K.; Yamamoto, K.; Yasui, A.; Yoshida, M.C. y Seki, S. 1998. *J. Mol. Biol.* **282**: 761-774.
- Sepúlveda, S.; Valenzuela, L.; Ponce, I.; Sierra, S.; Bahamondes, P.; Ramirez, S.; Rojas, V.; Kemmerling, U.; Galanti, N. y Cabrera, G. 2014. *J. Cell. Biochem.* **115**: 397-409.
- Spadiliero, B.; Nicolini, C.; Mascetti, G.; Henríquez, D. y Vergani, L. 2002. *J. Cell. Biochem.* **85**: 798-808.
- Stierum, R.H.; Croteau, D.L. y Bohr, V.A. 1999. *J. Biol. Chem.* **274**: 7128-7136.
- Stuart, K. 1991. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 327-344.
- Sun, B.; Latham, K.A.; Dodson, M.L. y Lloyd R.S. 1995. *J. Biol. Chem.* **270**: 19501-19508.
- Tardieux, I.; Webster, P.; Ravesloot, J.; Boron, W.; Lunn, J.A.; Heuser, J.E. y Andrews, N.W. 1992. *Cell* **71**: 1117-1130.

- Teixeira, A.R.L.; Nitz, N.; Guimaro, M.C.; Gomes, C. y Santos-Buch, C. 2006. *Postgrad. Med. J.* **82**: 788-798.
- Teixeira, D.E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P.H. y de Souza, W. 2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1749.
- Teixeira, S.M.R. 1998. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**: 1503-1516.
- Teixeira, S.M.R. y daRocha, W.D. 2003. *Genet. Mol. Res.* **2**: 148-158.
- Thayer, M.M.; Ahern, H.; Xing, D.; Cunningham, R.P. y Tainer, J.A. 1995. *EMBO J.* **14**: 4108-4120.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. y Gibson, T.J. 1994. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Toro, G.C. y Galanti, N. 1990. *Biochem. Int.* **21**: 481-490.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. 2001. *Int. J. Parasitol.* **31**: 472-481.
- Ulbert, S.; Eide, L.; Seeberg, E. y Borst, P. 2004. *DNA Repair* **3**: 145-154.
- WHO. 2010. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/)
- WHO. 2012. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/)
- Wilson, D.M. y Bohr, V.A. 2007. *DNA Repair*. **6**: 544-559.
- Wood, W.B. 1966. *J. Mol. Biol.* **16**: 118-133.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. y Messing, J. 1985. *Gene* **33**: 103-119.
- Yonekura, S.I.; Nakamura, N.; Doi, T.; Sugiyama, H.; Yamamoto, K.; Yonei, S. y Zhang, Q.M. 2007. *J. Radiat. Res.* **48**: 417-424.