



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



**“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ENDONUCLEASA
TRANSPOSÓNICA NL1 DE *Trypanosoma cruzi* EXPUESTA A DAÑO OXIDATIVO
DEL DNA”**

LUCÍA TERESITA VALENZUELA PÉREZ

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

PROFESOR GUÍA: GONZALO GERMÁN CABRERA VALLEJOS

**SANTIAGO – CHILE
2010**



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



**“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ENDONUCLEASA
TRANSPOSÓNICA NL1 DE *Trypanosoma cruzi* EXPUESTA A DAÑO OXIDATIVO
DEL DNA”**

LUCIA TERESITA VALENZUELA PÉREZ

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
Profesor Guía: Gonzalo Cabrera Vallejos
Profesor Consejero: Fernando Fredes Martinez
Profesor Consejero: Claudio Zúñiga Marti

**SANTIAGO – CHILE
2010**

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Dr. Norbel Galanti, en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Además, esta tesis de pre grado contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto Bicentenario Anillo ACT-29
- Proyecto Bicentenario Anillo ACT-112
- Proyecto RED-07
- Proyecto FONDECYT 1090124

DEDICATORIA

A Madre, Papi, Hermanos y Abuela.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alicia y Pedro, por haberme dado la vida y hacer de mí una gran mujer. Gracias por entregarme las herramientas para estudiar y ser una persona de bien. A mi padre, le agradezco infinitamente toda la ayuda que me ha brindado durante todos estos años; por las palabras de aliento y el soporte económico. A mi madre por sus sabias palabras, su apoyo moral y su consuelo en los momentos de dulce y agraz, también le entrego mis más sinceros agradecimientos. A mi abuela que se enorgulleció de su nieta y me brindó su alegría en la tierra, y desde el cielo, porque estoy segura que no ha dejado de acompañarme en ningún momento en todos estos años. A mis hermanos Angelo, Francisco, Nisa y José, que me han soportado durante todos estos años de estudio y que han depositado toda su confianza en mí.

Al profesor Norbel Galanti por aceptar que jugara en su laboratorio, por corregir mis conceptos y enseñarme el lado lindo que tiene este mundo de la ciencia. A mi profesor guía Gonzalo Cabrera, que pasó a ser uno más de mi familia, de quien he aprendido mucho más sobre esta ciencia que es la Biología. Gracias por aceptarme para trabajar contigo, por enseñarme cómo se trabaja en este mundo, por darme tu apoyo en mi tesis y por confiar en mí. A mi hermana mayor, compañera de laboratorio y otras tertulias. A la Sofy le agradezco infinitamente por ser mi partner y mi mentora. Gracias por ser mi consejera, por entregarme toda tu alegría y compañía. Gracias también por las caricaturas que tanto nos han hecho reír. A Carlita María gracias por su ayuda, por estar siempre atenta a mis necesidades. Por entregarme parte de su conocimiento. Por las tantas horas de conversaciones, risas y llantos.

A la chica Naty y a Javier mil gracias por todo su apoyo técnico, por mantener todos los materiales listos para que yo los ocupara. A los monos chicos del laboratorio, Santiago y José Pablo, por todo el apoyo y alegrías brindadas al final de este arduo caminar.

A mi queridísimo Charlie, gracias por ser tan maravilloso conmigo. Por todo el apoyo que me diste en este trabajo, por ayudarme con los papers, revisiones y demases. Por ser la inspiración en los momentos de último aliento. Gracias por tu acogida, por regalarme, por amarme tanto y hacer más lúdica esta tarea. Gracias por estar siempre ahí.

No menos importantes son mis amigos. Quisiera nombrarlos a todos, pero quiero representar en mi hermana y amiga Gemma y mi amigo Walter, mi cariño a quienes he conocido en este largo caminar. Gracias por estar siempre ahí y ayudarme en los momentos buenos y en los no tanto, por preguntar siempre por mí, por ser mis amigos. Los quiero infinitamente y creo que sin ustedes esto no hubiera sido lo mismo. Gracias también a mis amigos de otros laboratorios, de quienes he aprendido mucho, que además han aportado con su cariño y también con protocolos y reactivos. A Galia, Lupín, Carroll, Mariana y muchas gracias.

A todos quienes han estado presentes en estos largos años de estudio y que de una u otra manera han estado presentes en mi vida, también los llevo en el corazón.

Y sobre todo, gracias a Dios...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
FUENTES DE FINANCIAMIENTO	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE DE CONTENIDOS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	12
SUMMARY	14
1. INTRODUCCIÓN	16
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Etiología de la Enfermedad de Chagas	18
2.2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas	19
2.3 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
2.4 Signos clínicos y formas de presentación de la enfermedad de Chagas	25
2.5 Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas	27
2.6 Tratamiento de la Enfermedad de Chagas	28
2.7 Resistencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> frente al estrés oxidativo	29
2.8 Vía de reparación por escisión de bases (BER)	32
2.9 Elementos móviles y características de NL1Tc	33
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVO GENERAL	40

4.1 Objetivos específicos	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Amplificar el gen que codifica para la proteína NL1Tc e insertarlo en un vector de expresión de células procariontes.....	41
5.1.1. Amplificación de la secuencia codificante para la proteína NL1Tc..	41
5.1.2 Purificación del amplificado a partir de geles de agarosa.....	42
5.1.3 Digestión del amplificado y del vector de expresión con enzimas de restricción.....	42
5.1.4 Ligación del amplificado al vector de expresión.....	43
5.1.5 Precipitación del DNA ligado.....	43
5.1.6 Transformación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> BL21 pLys E	43
5.1.7 Selección de colonias positivas.....	44
5.1.8 Purificación y secuenciación de constructos.....	44
5.2 Obtener la proteína recombinante NL1Tc completa. Identificarla por secuenciación aminoacídica.....	45
5.2.1 Inducción de la expresión de NL1Tc.....	45
5.2.2 Purificación de la proteína recombinante NL1Tc.....	46
5.2.3 Identificación de la proteína NL1Tc recombinante purificada.....	46
5.2.4 Identificación de la proteína NL1Tc mediante espectrometría de masa	47
5.3 Generar de un anticuerpo policlonal anti- NL1Tc.....	47

5.3.1	Inmunización de ratones Balb/c y obtención de sangrías inmunes.....	47
5.3.2	Determinación de los niveles de anticuerpos anti-NL1Tc presentes en las diferentes sangrías.....	48
5.4	Determinar el nivel de expresión de NL1Tc en las formas celulares epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de la cepa Dm28c de <i>T. cruzi</i>	49
5.4.1	Cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	49
5.4.2	Cultivos celulares.....	49
5.4.3	Obtención de la forma infectiva (tripomastigotes) y formas replicativas intracelulares (amastigotes) de <i>T. cruzi</i>	50
5.4.4	Preparación de homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes.....	50
5.4.5	Determinación de los niveles de expresión de NL1Tc.....	51
5.5	Estimar el nivel de expresión de NL1Tc frente a estrés oxidativo, en epimastigotes de la cepa Dm28c de <i>T. cruzi</i>	51
6.	RESULTADOS	53
7.	DISCUSIÓN	72
8.	CONCLUSIONES	78
9.	BIBLIOGRAFÍA	79
10.	ANEXO 1	91

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Evolución de los linajes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 3. Vía de reparación por escisión de bases (BER).....	33
Figura 4.- Comparación de los dominios que contienen los residuos sitio activo de la secuencia de consenso de AP con los dominios conservados de NL1Tc. Los asteriscos indican los aminoácidos no consensuados.....	36
Figura 5.- Alineamiento de la proteína NL1Tc con endonucleasas AP de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcAP1) y <i>Homo sapiens</i> (APE1).....	60
Figura 6.- Comparación de modelos tridimensionales de NL1Tc de <i>Trypanosoma cruzi</i> y APE1 de <i>Homo sapiens</i>	61
Figura 7.- Secuencia nucleotídica codificante para la endonucleasa NL1Tc.....	62
Figura 8.- Amplificados de dna del gen codificante para NL1Tc de <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	63
Figura 9.- Detección del inserto de DNA codificante para NL1Tc en el vector pQE [®] -80L.....	64
Figura 10.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para NL1Tc y el producto de la secuenciación automática del constructo pQE [®] -80L-NL1Tc.....	65
Figura 11.- Identificación de la proteína recombinante NL1Tc en homogeneizados de bacterias <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLys E transformadas con el constructo pQE [®] -80L-NL1Tc.....	66
Figura 12.- Identificación de la proteína recombinante NL1Tc purificada.....	67

Figura 13.- Identificación de NL1Tc recombinante mediante espectrometría de masa.....	68
Figura 14.- Cuantificación de niveles de anticuerpos anti-NL1Tc en sueros de ratones inmunizados	69
Figura 15.- Detección de la proteína NL1Tc en homogeneizados de proteínas totales de amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Dm28c de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 16.- Niveles de expresión de la proteína NL1Tc en extractos proteicos de epimastigotes tratados durante diferentes tiempos con H ₂ O ₂ 200 μM.....	71

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana tiene como agente biológico el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad posee un carácter endémico en América Latina y se estima un promedio de 10-15 millones de personas infectadas y 75-90 millones en riesgo de contraer la enfermedad. *T. cruzi* posee un ciclo de vida indirecto y se presenta en tres formas celulares; epimastigote, forma extracelular replicativa y no infectiva, presente en los vectores triatomínicos; tripomastigote, forma no replicativa e infectiva, que se encuentra tanto en el vector como en hospederos mamíferos y finalmente, la forma amastigote, intracelular replicativa, presente en hospederos mamíferos.

Trypanosoma cruzi es capaz de sobrevivir frente al daño oxidativo del DNA producido por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) del hospedero mamífero. Este daño podría ser reparado mediante la actividad de la endonucleasa APE1 de la vía de escisión de bases (BER). Sin embargo, sólo hemos identificado APE1 de *T. cruzi* (TcAP1) en la forma epimastigota del parásito, pero no se ha detectado en las formas tripomastigotes o amastigotes.

NL1 de *T. cruzi* (NL1Tc) es una endonucleasa retrotransposónica de la familia AP que podría realizar la misma función que cumple TcAP1 en epimastigotes, pero en tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.

Se clonó el gen que codifica para NL1Tc y se confirmó su pertinencia por secuenciación. Por otra parte, se generó la proteína recombinante NL1Tc y por modelamiento en 3D por homología se confirmó corresponde a una endonucleasa. La proteína recombinante purificada se empleó para producir un anticuerpo policlonal específico, el cual se utilizó posteriormente para la identificación de NL1Tc en homogeneizados de las distintas formas celulares del parásito y evidenciar su grado de expresión en epimastigotes de la cepa Dm28c tratados con H₂O₂ 200 μM.

Se concluye que la proteína NL1Tc se expresa en las tres formas celulares de *T. cruzi*, y en las condiciones experimentales empleadas, no se observa sobreexpresión de NL1Tc frente a estrés oxidativo, sin embargo no se descarta su participación en la reparación del DNA.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi, a parasitic protozoan, is the etiological agent of Chagas' disease, an endemic pathology in Latin America affecting 10-15 million persons with more than 75-90 million persons at risk. The transmission of the disease is produced by an infected triatomine insect that upon feeding on mammalian blood, deposits feces with infective parasites (trypomastigotes) which enter the mammalian body mainly through the skin wound produced by the insect. Upon entering the body, the parasites invade macrophages taking a round, replicative form, the amastigote. After replication, the amastigotes transform back to trypomastigotes that circulates in the blood invading heart, ganglia and other tissues. Trypomastigotes are taken with a blood meal by the triatomine; the trypomastigotes differentiates to epimastigotes, an extracellular replicative form in the insect midgut. Epimastigotes migrate to the end of the insect intestine transforming back to the tripomastigote infective form.

Trypanosoma cruzi is able to survive when exposed to oxidative DNA damage produced by reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) produced by different hosts. This damage may be repaired by activity of the endonuclease APE1 from the base excision repair system (BER). However, we have identified APE1 of *T. cruzi* (TcAP1) only in epimastigotes, but have not detected this enzyme in trypomastigotes and amastigotes cellular forms.

NL1 of *T. cruzi* (NL1Tc) is a retrotransposonic endonuclease of AP family that could perform the same function as the TcAP1 in epimastigotes, but in trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi*.

The gen that codifies NL1Tc was cloned and its pertinence was confirmed by DNA sequencing. The recombinant protein NL1Tc was generated and it was confirmed, by 3D-homology modelling, that it corresponds to an endonuclease. The purified recombinant protein was used to produce a specific polyclonal antibody that was later on employed for the identification of NL1Tc in total protein homogenates from different cellular forms of the parasite and to determine the expression level in epimastigotes of the strain Dm28c treated with H₂O₂ 200 µM.

It is concluded that the NL1Tc protein is expressed in the three cellular forms of *T. cruzi* and that, under the experimental conditions used, an over-expression of NL1Tc exposed to oxidative stress is not observed; however, its participation in DNA repair is not discarded.

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado, agente causal de la enfermedad de Chagas. Presenta un ciclo de vida indirecto con tres formas celulares: epimastigote (extracelular y replicativa) que se desarrolla en intestino anterior del vector hematófago; amastigote (intracelular y replicativo) y tripomastigote (extracelular no replicativo), estos últimos presentes en los hospederos definitivos mamíferos. Formas tripomastigotes también se encuentran en el tubo digestivo posterior y en las deposiciones del vector.

Trypanosoma cruzi es capaz de sobrevivir al daño oxidativo del DNA generado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) producidas por células del sistema inmune innato del hospedero mamífero. El principal mecanismo de reparación de daño oxidativo del DNA es la vía de escisión de bases (BER), un proceso altamente conservado durante la evolución. Una proteína fundamental que opera en esta vía es la endonucleasa apurínica/apirimidínica APE1.

Indagaciones previas realizadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Dr. Norbel Galanti, en la facultad de Medicina de la Universidad de Chile, indican que APE1 de *T. cruzi* (TcAP1) sólo se expresa en la forma epimastigota de *T. cruzi*. Sin embargo, la vía BER funciona en las tres formas celulares del parásito. Por este motivo, debiera existir una proteína con características de endonucleasa apurínica/apirimidínica, que se encuentre realizando la función de TcAP1 en las formas tripomastigotes y

amastigotes. Estudios previos señalan que la sobreexpresión de la endonucleasa apurínica/apirimidínica transposónica NL1 de *T. cruzi* (NL1Tc) produce una disminución significativa de la citotoxicidad frente a agentes genotóxicos en epimastigotes. Estos resultados sugieren que probablemente NL1Tc participaría de la vía BER, expresándose en las formas epimastigotas, amastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiología de la Enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Este orden se caracteriza por presentar una gran mitocondria que posee entre un 15 a 30 % del DNA celular. Los tripanosomátidos pertenecen a una de las ramas divergentes más antiguas en la evolución de eucariontes, estimándose su aparición en la tierra hace 2.000 millones de años (Cavalier-Smith, 1993). Además presentan interesantes características biológicas como “trans/splicing nuclear”, edición del DNA en el kinetoplasto, síntesis policistrónica del RNA y ausencia de condensación de la cromatina durante la división celular (Toro *et al.*, 1988; McCarthy-Burke *et al.*, 1989; Elias *et al.*, 2001; Spadiliero *et al.*, 2002; Lukes *et al.*, 2005). La familia Trypanosomatidae también se encuentra relacionada con otras patologías como la Enfermedad del sueño o Tripanosomiasis africana y la Leishmaniasis, que junto con la enfermedad de Chagas son de gran importancia para la medicina humana y animal, razón por la cual este grupo ha sido blanco de numerosos estudios a nivel mundial (De Souza, 2002).

2.2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, fue descrita por primera vez por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909 al detectar parásitos flagelados en la sangre periférica de una niña de dos años que padecía una enfermedad cuyos signos y síntomas no se correlacionaban con ninguna patología descrita previamente. Este investigador es el único en la historia de la medicina que describe con gran detalle el ciclo de transmisión de una enfermedad (vector, hospedero y agente infeccioso) y las manifestaciones clínicas agudas que se presentan en humanos (Rassi *et al.*, 2010). El agente causal de esta enfermedad fue denominado por Chagas como *T. cruzi*, en honor a su maestro Oswaldo Cruz (Chagas, 1909).

La Tripanosomiasis Americana es, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas en el mundo. En consecuencia es un problema social y económico de gran relevancia (Rassi *et al.*, 2010), ya que afecta principalmente a personas que viven en áreas rurales remotas o con condiciones sanitarias deficientes. Hoy en día es una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública en América Latina (Prata, 2001). Esta patología es considerada una infección enzoótica, que se transmite a través de insectos vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae conocidos comúnmente con el nombre de vinchucas (Texeira *et al.*, 2008). En Chile, los principales agentes involucrados en la transmisión de *T. cruzi* son *Triatoma infestans*, que presenta un ciclo de vida domiciliario y *Mepraia spinolai*, de ciclo de vida silvestre. Recientemente se ha descrito una tercera especie *Mepraia gajardoi*, que participa

del ciclo silvestre, habitando playas y desiertos costeros de las regiones de Arica-Parinacota, Tarapacá y Antofagasta (Carvajal *et al.*, 2007).

Los reservorios de *T. cruzi* corresponden a más de 150 especies de mamíferos, tanto silvestres (por ejemplo roedores, marsupiales y armadillos) como domésticos (perros, gatos, cobayos, entre otros) (Olea, 2009).

Trypanosoma cruzi se encuentra presente en el continente americano desde hace más de 9.000 años, extendiéndose desde el paralelo 43 norte hasta el paralelo 49 sur, involucrando alrededor de 17 países. Se estima que entre 10 a 15 millones de personas se encuentran infectadas en América Latina y que entre 75 a 90 millones están expuestas a contraer la infección (Coura, 2007; Yun *et al.*, 2009). De acuerdo a lo informado por países donde la enfermedad de Chagas es endémica, anualmente el número de casos nuevos debido a transmisión vectorial es de 41.200 (7,7 por cada 100.000 individuos) y de 14.385 de Chagas congénito (WHO, 2005). Por otro lado, según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12% dependiendo del país estudiado y de la edad, estado fisiológico y modalidad de tratamiento recibido por el paciente (WHO, 2002).

En nuestro país, el área endémica de la enfermedad de Chagas se extiende desde la región Arica-Parinacota hasta la región del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana, siendo más frecuente en áreas rurales y periurbanas. Se calcula que la población expuesta a la enfermedad es de aproximadamente 850.000 personas (Apt *et al.*, 2008). Actualmente existen alrededor de 142.000 habitantes infectados, concentrados

mayoritariamente en la región de Coquimbo, donde se ha registrado la más alta tasa acumulada de mortalidad, 20 por 100.000 habitantes (MINSAL, 2007). La mortalidad en Chile se ha mantenido constante con una tasa de 0,35-0,40 por 100.000 habitantes, lo que corresponde a 50-60 muertes al año. Éstas representan el 0,07% de las muertes totales anuales (MINSAL, 2007). Pese a que en 1999 Chile fue declarado libre de transmisión vectorial (MINSAL, 2004) aún es una enfermedad que debe ser notificada.

Durante mucho tiempo se ha clasificado a *T. cruzi* en dos grupos genéticos divergentes o linajes: *T. cruzi* I (TcI) que desarrolla un ciclo de vida de tipo selvático, infectando principalmente pequeños mamíferos y marsupiales silvestres, responsable de los casos humanos en el altiplano chileno-boliviano y algunos casos en Venezuela; y *T. cruzi* II (TcII) que se presenta en el ciclo doméstico, siendo el principal responsable de la enfermedad de Chagas en humanos (Di Noia *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2005; Manoel-Caetano y Silva, 2007; Apt *et al.*, 2008). Sin embargo, diversos estudios genéticos realizados en *T. cruzi* determinaron una nomenclatura que separa al parásito en seis grupos genéticos, donde TcI y TcIIb serían los linajes más antiguos y TcIIa, TcIIc, TcIIId y TcIIe tendrían su origen en hibridaciones generadas a lo largo de la evolución del parásito (figura 1) (Texeira *et al.*, 2006). Actualmente, en el marco de un consenso alcanzado en el segundo simposio satélite de nomenclatura de *T. cruzi* en Buzios, Brasil en agosto de 2009 se definió la siguiente clasificación para estos linajes: TcI (antiguo TcI), TcII (antiguo TcIIb), TcIII (antiguo TcIIc), TcIV (antiguo TcIIa), TcV (antiguo TcIIId), TcVI (antiguo TcIIe) (Zingales *et al.*, 2009).

célula hospedera, el tripomastigote es incorporado en una vesícula parasitófora, de la cual logra escapar para diferenciarse en amastigote y replicarse libremente en el citosol. Después de aproximadamente 9 ciclos de división celular, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes altamente móviles que lisan la célula del mamífero y regresan al torrente sanguíneo, dirigiéndose a órganos como miocardio y músculo liso visceral (Andrade y Andrews, 2005). Posteriormente, los tripomastigotes sanguíneos al ser ingeridos por triatominos se diferencian, en el intestino anterior, a epimastigotes (forma extracelular y replicativa). Estos últimos, cuando alcanzan el tracto digestivo posterior del insecto vector, se adhieren a él a través de su flagelo y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Una vez que se despegan de la pared intestinal, son eliminados por las heces de la vinchuca, cerrando el ciclo de vida (Tyler y Engman, 2001).

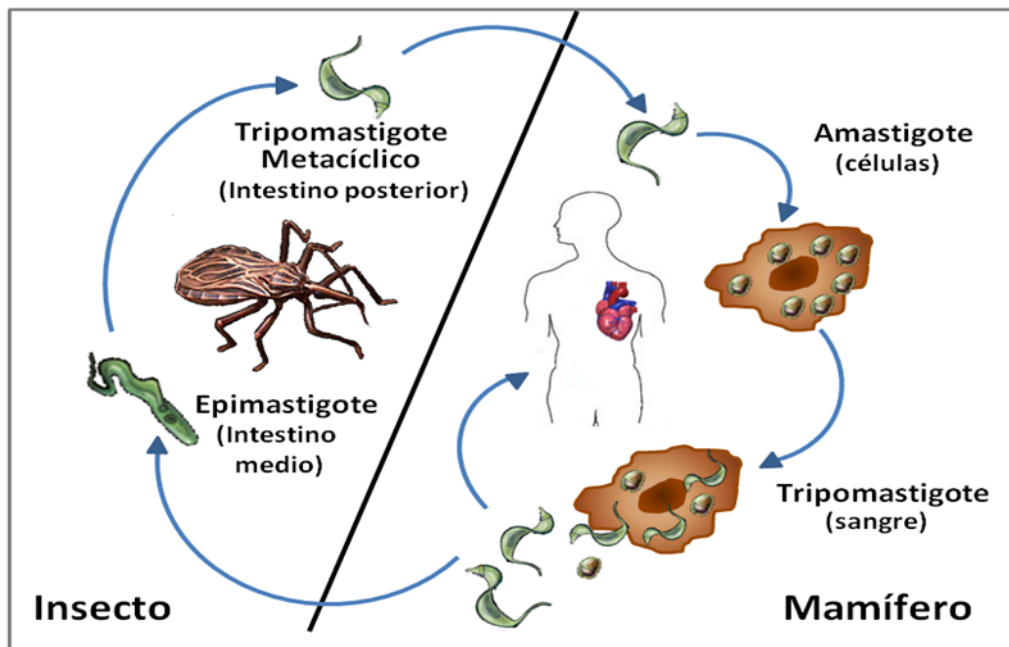


Figura 2.- Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

(Adaptado de Vázquez, 2007)

Actualmente la transmisión vectorial de la enfermedad ha sido controlada fundamentalmente gracias a la implementación de programas para la erradicación de *T. infestans* mediante el uso de insecticidas piretroides (Prata, 2001). Además existen tres iniciativas multinacionales que han permitido el control de la patología a través de muestreo en bancos de sangre para detectar la presencia del parásito. Estos programas, iniciados a principios de los años noventa en el cono sur han sido altamente exitosos, permitiendo una disminución del 70% en la incidencia de la infección en jóvenes y que países como Uruguay, Chile y seis de los mayores estados de Brasil, hayan sido certificados como libres de la transmisión vectorial (Cevallos y Hernández, 2001).

Además de la transmisión vectorial, existen otras formas importantes de transmisión de la enfermedad como lo son la transfusión sanguínea, la vía transplacentaria, el trasplante de órganos, la transmisión oral por alimentos contaminados con el parásito y algunos accidentes de laboratorio (Prata, 2001; Apt *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010). Estas formas alternativas de infección han adquirido cada vez más importancia epidemiológica (Yoshida, 2008), debido fundamentalmente al proceso de globalización, donde viajeros e inmigrantes infectados, que se mueven desde zonas rurales a ciudades y otros países, introducen la enfermedad en lugares donde no es considerada endémica (Prata, 2001; Schmunis y Yadon, 2009).

2.4 Signos clínicos y formas de presentación de la Enfermedad de Chagas

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

La fase aguda comienza poco después de la inoculación del parásito en el individuo, pudiéndose encontrar tripanosomas en la sangre (Anón, 2006) debido a la intensa multiplicación de amastigotes en macrófagos y posterior liberación de tripomastigotes a la circulación periférica (Andrade y Andrews, 2005). Esta fase tiene una duración de entre 4 a 8 semanas y los síntomas pueden aparecer 1 a 2 semanas después del ingreso del parásito o después de unos meses en el caso de transplantes de órganos y transfusiones sanguíneas (Rassi *et al.*, 2010). Posterior a la picadura del vector, se puede generar una lesión focal en la piel en el sitio de inoculación. Esta lesión se denomina chagoma y consiste en una zona indurada de eritema, acompañada de inflamación de ganglios locales. Cuando la entrada ha sido por la conjuntiva ocular, se produce un edema de los párpados unilateral no doloroso denominado Signo de Romaña (Cevallos y Hernández, 2001; Prata, 2001, Anón, 2006; Coura, 2007; Rassi *et al.*, 2010). En aproximadamente el 95% de los casos la fase aguda se presenta como asintomática; sin embargo, en el porcentaje restante se pueden evidenciar signos altamente variables, como fiebre, dolor de cabeza, anorexia, malestar, edema intersticial, mialgia, debilidad, náuseas, vómitos, diarrea, hepatomegalia, esplenomegalia, miocarditis, linfadenopatía local o generalizada y meningoencefalitis en los casos severos. El tratamiento con drogas antichagásicas en esta fase, usualmente controla la infección aguda y previene las manifestaciones crónicas (Rassi *et al.*, 2010). En pacientes sintomáticos, se ha estimado una mortalidad de entre 1:2.500 a 1:5.000 y se presenta cuando se desarrolla una miocarditis severa o una meningoencefalitis o ambas con

complicaciones asociadas como bronconeumonía (Prata, 2001; Texeira *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010).

La fase aguda usualmente es seguida de un período en el que no se presentan síntomas y puede tener una duración variable, de meses a años. Esta es la fase indeterminada, donde el 70% a 80% de los pacientes nunca llegan a presentar síntomas de la enfermedad (Anón, 2006). En general, en esta fase sólo es posible detectar la infección con *T. cruzi* por la presencia de anticuerpos específicos (Cevallos y Hernández, 2001). Los exámenes radiográficos tomados durante esta fase muestran normalidad en tórax, esófago y colon y al electrocardiograma no se presentan alteraciones (Prata, 2001; Texeira, *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2010).

El restante 20 a 30% de los individuos infectados con *T. cruzi* ingresa a la fase crónica de la enfermedad generalmente después de 5 a 15 años. En esta fase se presentan fallas orgánicas, que frecuentemente incluyen alteraciones cardíacas en el 94,5% de los casos y digestivas en el 4,5% (Texeira *et al.*, 2008). Lo más común es que se presente miocarditis asociadas a arritmias, cardiomiopatías dilatadas e hipertrofia de las fibras miocárdicas (Anón, 2006; Coura, 2007). A su vez, pacientes con anormalidades digestivas pueden cursar cuadros de megaesófago o megacolon por denervación del sistema nervioso autónomo (Cevallos y Hernández, 2001; Anón, 2006, Coura, 2007). En esta etapa, la enfermedad puede ser inhabilitante o causar la muerte del paciente. El curso de la patología depende de diferentes factores como carga parasitaria en el sitio de la inoculación, grupo genético y cepa del parásito, primoinfección o reinfección, estado inmunológico del hospedero y tipo de vector triatomino (Coura, 2007). Así, se ha observado que pacientes

inmunodeprimidos (como individuos VIH positivo) desarrollan una de las formas más severas de la enfermedad, presentando signos neurológicos, cardiacos y en algunos casos, abscesos cerebrales. Además, en este tipo de pacientes existe riesgo de reagudización de la enfermedad debido a la reactivación de la replicación de amastigotes persistentes en algunos tejidos (Anón, 2006; Rassi *et al.*, 2010).

2.5 Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

El diagnóstico se determina según la fase en que se encuentre el paciente. En la fase aguda, el método de elección para diagnosticar la enfermedad es la observación directa al microscopio de tripomastigotes en sangre. También se puede realizar el aislamiento de *T. cruzi* mediante xenodiagnóstico, utilizando vinchucas de laboratorio libres del parásito que se alimentan de la sangre del individuo a diagnosticar. Pasadas 4 semanas, se analiza el tracto intestinal del vector en busca de formas parasitarias. Cuando este procedimiento se realiza con todos los cuidados necesarios, se puede observar una positividad de casi todos los pacientes que cursan la fase aguda, y de un 50% en los pacientes con Chagas crónico (Cevallos y Hernández, 2001; Rassi *et al.*, 2010). Por otra parte, en la fase crónica de la enfermedad, la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* puede ser detectada por métodos serológicos como inmunofluorescencia, hemoaglutinación indirecta e inmunoensayo (ELISA). Sin embargo, debido a la inmunogenicidad cruzada que presenta *T. cruzi* con parásitos del género *Leishmania*, es necesario el uso de al menos dos de estas técnicas para considerar como positivo de Chagas a un paciente. Otra forma de diagnóstico que ha cobrado vital importancia es la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR). Sin

embargo, este ensayo no se realiza como examen de rutina y sólo se aplica en centros especializados (Cevallos y Hernández, 2001; Rassi *et al.*, 2010).

2.6 Tratamiento de la Enfermedad de Chagas

Actualmente los fármacos más utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas son Nifurtimox (3-metil-N-[(5-nitro-2-furfuril) metilene]-4-tiomorfolinoamina-1,1-dioxido) y Benznidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida). Ambas drogas tripanocidas actúan contra las diferentes formas del parásito. Nifurtimox actúa vía reducción del grupo nitro a radicales nitro anión, los cuales producen una reacción altamente tóxica. En cambio, el mecanismo de acción del Benznidazol involucra la unión covalente a macromoléculas por nitrorreducción (Urbina y Docampo, 2003). Se ha comprobado que Benznidazol posee el mejor perfil de seguridad y eficacia y por lo tanto es usualmente utilizada como primera línea de tratamiento (Rassi *et al.*, 2010). Si bien estos fármacos poseen un alto grado de eficacia para el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad en individuos jóvenes, en adultos o pacientes crónicos presentan baja eficacia clínica y efectos colaterales no deseados, lo que determina en muchas oportunidades el fracaso terapéutico (WHO, 2005). Estos antecedentes evidencian la necesidad de desarrollar nuevas drogas más eficientes en la eliminación del parásito, así como más inocuas para el hospedero definitivo.

La ausencia de fármacos efectivos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas hacen necesaria la exploración de nuevas áreas dentro de la biología de *T. cruzi*, que

puedan utilizarse a futuro como blancos terapéuticos. Una de estas áreas se relaciona con la capacidad de *T. cruzi* de sobrevivir en ambientes con alto estrés oxidativo, principalmente en el interior de células del hospedero.

2.7 Mecanismos de defensa y resistencia de *T. cruzi* frente al estrés oxidativo.

El metabolismo aeróbico utiliza oxígeno molecular como aceptor final en la transferencia de electrones dentro de la mitocondria, donde es reducido a moléculas de agua. Sin embargo, sucesivas reducciones univalentes del oxígeno molecular pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) altamente inestables, tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (OH^{\cdot}) (Shackelford *et al.*, 2000). Estas ROS pueden generar daño a diferentes macromoléculas celulares. Por otra parte, células del sistema inmune innato, particularmente los macrófagos, pueden producir gran cantidad de ROS, y óxido nítrico (NO), en respuesta a microorganismos patógenos. A pesar que el $O_2^{\cdot-}$ no es una molécula muy reactiva, este radical puede reaccionar con NO y producir anión peroxinitrito, agente generado comúnmente por macrófagos como primera línea de defensa durante la fagocitosis (Hogg *et al.*, 1992). Además, $O_2^{\cdot-}$ es un precursor de H_2O_2 que a su vez, en presencia de hierro (II) y cobre (I), es responsable de la formación de OH^{\cdot} (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La mayoría de los parásitos protozoos son células aeróbicas que viven en ambientes oxigenados. En mamíferos, la respuesta a infecciones con *T. cruzi* depende de la activación de células del sistema inmune innato dependientes de citoquinas, como IL-12, IFN- γ y

TNF- α . El ingreso de tripomastigotes a macrófagos induce la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), esenciales para el control de la infección. Sin embargo, estos mecanismos de defensa no son capaces de eliminar completamente al parásito, estableciéndose una infección crónica en el hospedero vertebrado (Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Peluffo *et al.*, 2004; Piacenza *et al.*, 2009). A su vez, se ha detectado una generación sostenida de ROS/RNS en células cardíacas con amastigotes en su citoplasma, en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, los amastigotes son capaces de resistir el estrés oxidativo y sobrevivir largos períodos dentro de la célula hospedera (Machado *et al.*, 2000; Zacks *et al.*, 2005; De Oliveira *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009; Piacenza *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha descrito que los epimastigotes también son capaces de sobrevivir al ambiente oxidativo que se genera en el intestino medio del vector triatomino producto de la degradación de la hemoglobina presente en la sangre ingerida por el parásito (Graça-Souza *et al.*, 2006). La hemoglobina, formada por cuatro subunidades de globina asociadas a un grupo hem, se encuentra involucrada en muchas reacciones biológicas, que incluyen entre otras transporte de oxígeno. El grupo hem es un anillo tetrapirrólico (protoporfirina IX) que contiene un ión ferroso en la posición central del anillo. El catabolismo del grupo hem puede generar ROS, mediante la reacción de Fenton, debido a la liberación ión ferroso (Balla *et al.*, 2005; Gozzelino *et al.*, 2010).

Diversas indagaciones demuestran que *T. cruzi* cuenta con sistemas enzimáticos que le permiten sobrevivir en ambientes oxidantes. Sin embargo, éstos presentan importantes diferencias con células de mamíferos (Krauth-Siegel y Coombs, 1999; Turrens, 2004). Por

ejemplo, en *T. cruzi* no se ha detectado actividad catalasa ni glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Wilkinson y Kelly, 2003; Turrens, 2004). Los principales mecanismos de *T. cruzi* implicados en la defensa contra ROS/RNS son glutatión reducido (GSH) y un conjugado GSH-espermidina conocido como tripanotión, característico de todos los tripanosomátidos (Krauth-Siegel y Coombs, 1999; Krieger *et al.*, 2000; Ariyanayagam y Fairlamb, 2001; Oza *et al.*, 2002; Turrens, 2004). Además, se ha descrito la existencia de dos glutationes peroxidadas dependientes de cisteína y dos triparredoxinas peroxidadas con diferentes localizaciones subcelulares y especificidad de sustrato (Wilkinson *et al.*, 2000; Wilkinson *et al.*, 2002a; Wilkinson *et al.*, 2002b; Piacenza *et al.*, 2008).

A pesar de que todas las macromoléculas celulares están sujetas a daño por ROS/RNS, las consecuencias deletéreas primarias de estrés oxidativo probablemente se relacionen con el daño al DNA (Riley, 1994). Células procariontes y eucariontes se encuentran constantemente expuestos a agentes oxidantes endógenos y exógenos que inducen daño en el DNA generando lesiones de base, formación de sitios abásicos (AP) y quiebres de hebras simple y doble, entre otras (Hazra *et al.*, 2007). Estas alteraciones del DNA son rápidamente detectadas por la célula, activando una serie de mecanismos destinados a detener del ciclo celular y reparar el DNA dañado. Sin embargo, si el nivel de daño sobrepasa estos mecanismos de reparación se desencadena la muerte celular programada (Barzilai y Yamamoto, 2004; Hazra *et al.*, 2007).

De esta forma, para el establecimiento de una infección crónica, *T. cruzi* debe resistir el daño oxidativo al DNA debido a ROS/RNS generado por las células del

hospedero. Los mecanismos conducentes a reparar el daño oxidativo al DNA en *T. cruzi* son desconocidos.

2.8 Vía de reparación por escisión de bases (BER)

Los principales mecanismos involucrados en la reparación del daño al DNA en eucariontes son: la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER), la vía de reparación por escisión de bases (BER), la reparación de bases mal apareadas (MMR), la reparación por recombinación homologa (HR) y la reparación de extremos no homólogos (NHEJ) (Lindahl y Wood, 1999; Hoeijmakers, 2001).

El daño oxidativo al DNA, es reparado principalmente a través del sistema BER (figura 3), el cual permite mantener la integridad del material genético nuclear y mitocondrial (Mandavilli *et al.*, 2002; Slupphaug *et al.*, 2003; Hegde *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2009). Esta vía, evolutivamente conservada, se inicia cuando una DNA glicosilasa elimina la base que se encuentra dañada. Posteriormente una endonucleasa apurínica/apirimidínica (AP) corta el enlace 5' fosfodiéster, generando un extremo 3'-hidroxilo libre. Finalmente una DNA polimerasa β incorpora el nucleótido correcto y una DNA ligasa III une los extremos 3'-5' de la hebra de DNA (Fishel y Kelley 2007).

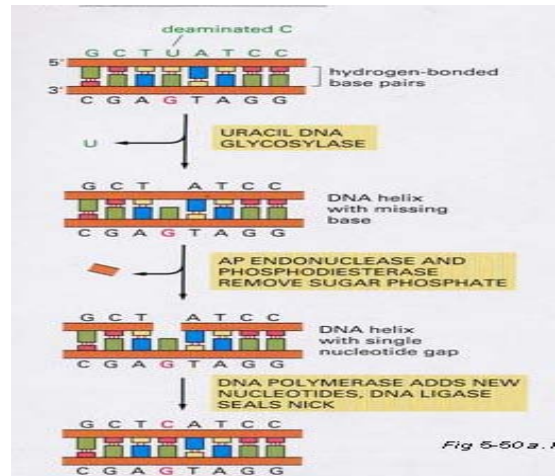


Figura 3.- Vía de reparación por escisión de bases (BER) (tomado de Alberts, B. *et al.*, 2002)

2.9 Elementos móviles y características de NL1Tc en la reparación del DNA

Los elementos móviles, transponibles o también llamados secuencias repetidas dispersas, son fragmentos de DNA que tienen la capacidad de moverse a lo largo del genoma e insertarse en un lugar distinto al de origen (López *et al.*, 1999; Kazazian, 2004; Bringaud *et al.*, 2008).

Estos elementos, según la mayoría de los autores, pueden ser clasificados en dos grandes grupos de acuerdo a su modo de transposición: elementos de clase I o retroposones, que tienen la capacidad de transponerse por un proceso que involucra transcripción reversa a partir de un RNA intermediario, es decir, el flujo de información genética ocurre de RNA a DNA; y los elementos de clase II o transposones que son aquellos elementos que se mueven a lo largo del DNA por escisión-inserción como mecanismo de transposición (Finnegan, 1997; López *et al.*, 1999; Sinzelle *et al.*, 2009).

Los elementos de clase I pueden ser divididos a su vez en dos subgrupos: los SINE o elementos cortos de DNA disperso y los retrotransposones. Estos últimos teóricamente tienen la capacidad de codificar las enzimas necesarias para su propia transposición. Dentro de este grupo podemos encontrar a los elementos LTR (terminaciones largas repetidas) y los elementos no-LTR también denominados elementos LINE (secuencias largas repetidas dispersas) (López *et al.*, 1999).

Si bien los retrotransposones no-LTR fueron encontrados originalmente en el genoma de mamíferos, han sido detectados en una amplia variedad de especies desde protozoos y hongos, hasta plantas y animales. Aunque son considerados como el grupo más antiguo presente en los eucariontes, su rol aún no es bien conocido. En los últimos años se ha demostrado que las inserciones de elementos LINE poseen interesantes características estructurales asociadas, las que pueden ser importantes para la evolución de las especies (Olivares *et al.*, 1997; Olivares *et al.*, 2003).

En *T. cruzi*, se han descrito secuencias de DNA repetidas-dispersas (o elementos móviles) que representan alrededor del 30% del genoma, las cuales podrían estar relacionadas con fenómenos de reordenamiento y control de la expresión génica. De ellos, entre un 5 a 15% del genoma de *T. cruzi* se encuentra compuesto por retrotransposones (López *et al.*, 1999; Heras *et al.*, 2005; Bringaud *et al.*, 2008).

Dentro del genoma de *T. cruzi* se ha descrito la existencia de múltiples copias de un elemento no-LTR, denominado elemento L1 (L1Tc), y se sugiere que éste confiere al

parásito un polimorfismo significativo y un alto grado de plasticidad (López *et al.*, 1999; Heras *et al.*, 2005). Es un elemento que se transcribe activamente ya que contiene la maquinaria enzimática necesaria para su transposición autónoma (Heras *et al.*, 2005). Este elemento LINE 1 de *T. cruzi* (L1Tc), se caracteriza por presentar 3 sitios abiertos de lectura u “Open Reading Frame” (ORF). El primero de ellos codifica para la proteína NL1Tc que tiene gran homología con miembros de la familia de endonucleasas AP y que probablemente estarían implicadas en la transposición del elemento (López *et al.*, 1999; Olivares *et al.*, 1999; Olivares *et al.*, 2003). En consecuencia, generarían un sitio libre 3'-OH en el DNA cromosomal, donde posteriormente debería ocurrir la integración del elemento transponible (Olivares *et al.*, 1997). El segundo marco abierto de lectura codifica para un polipéptido con actividad transcriptasa inversa y para la enzima RNasa H. Por último, el tercer sitio abierto de lectura codifica para una proteína con actividad integrasa (López *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que la existencia de dominios conservados entre la familia de endonucleasas AP y algunos retrotransposones no-LTR es una característica general común a todos los elementos sitio no específicos. Estudios bioquímicos muestran que la proteína codificada en el ORF2, en el extremo amino terminal del elemento LINE1 (L1) de humanos, también posee actividad endonucleasa *in vitro*, pero no muestra preferencia por sitios AP como NL1 de *T. cruzi* (Olivares *et al.*, 1997).

Mediante estudios de homología de secuencias y de estructura, se ha podido evidenciar que NL1Tc presenta una alta homología (mayor al 65%) con los dominios que contienen los sitios activos de la exonucleasa III de *E. coli* y un 80% con los residuos del

sitio activo de la DNasa I humana (Martin *et al.*, 1996; Olivares *et al.*, 1999) (figura 4). Se ha demostrado que la endonucleasa NL1Tc, al igual que TcAP1, confiere viabilidad por complementación a bacterias *E. coli* doble mutante letal que carecen de actividad exonucleasa III cuando éstas son expuestas a agentes alquilantes y oxidantes que causan daño en el DNA (Olivares *et al.*, 1999).

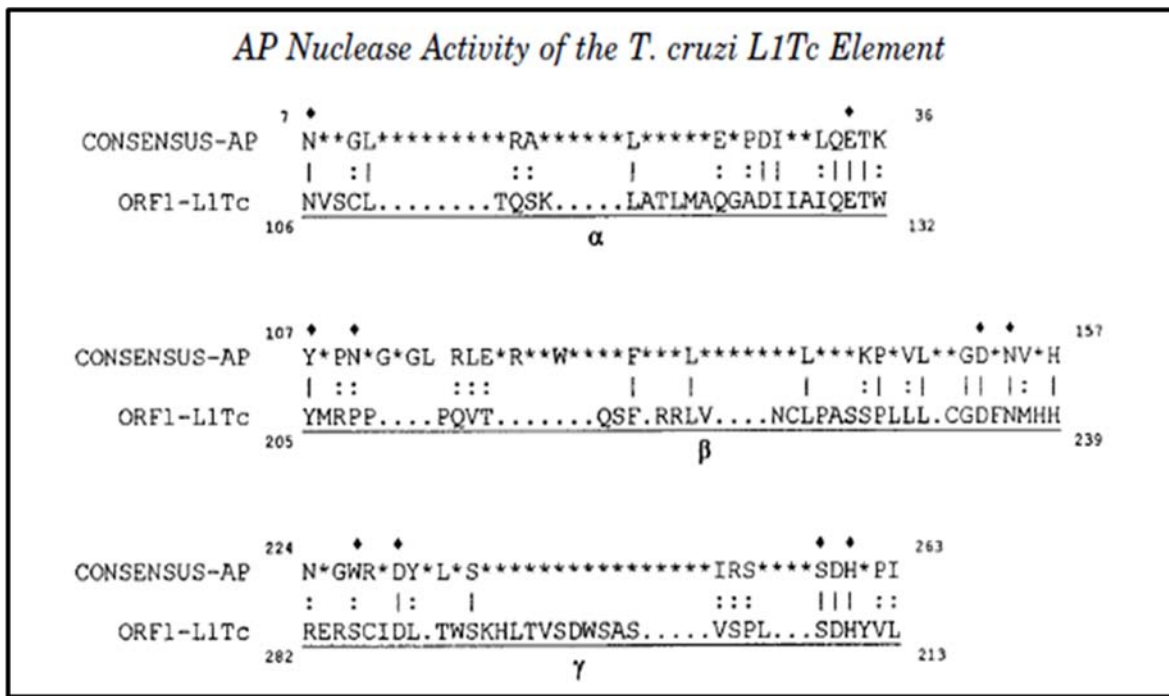


Figura 4.- Comparación de los dominios que contienen los residuos sitio activo de la secuencia de consenso de AP con los dominios conservados de NL1Tc. Los asteriscos indican los aminoácidos no consensuados. Los espacios presentes en el ORF1 fueron introducidos para un mejor alineamiento y se indican con puntos. Los números a la derecha e izquierda de cada secuencia indican la posición real de los aminoácidos de las secuencias comparadas. Los aminoácidos idénticos y conservados se indican con líneas verticales y dos puntos, respectivamente. Los aminoácidos se consideraron conservados cuando presentan puntuación positiva según la tabla de Dayhoff. Las regiones de alta homología, indicadas por letras griegas, fueron subrayadas. Los residuos de sitio activo para la enzima exonucleasa III, fueron marcados con ♦ (Olivares *et al.*, 1997).

Por otra parte, algunos estudios demuestran que la actividad de la endonucleasa NL1Tc confiere protección a epimastigotes enfrentados a diversos agentes genotóxicos. Utilizando un vector de expresión específico para *T. cruzi* se logró la sobreexpresión de la proteína NL1Tc en esta forma celular. Así, fue posible evidenciar una reducción de 60% del daño al DNA en parásitos sometidos a tratamientos con el agente antineoplásico daunorubicina. Igualmente, epimastigotes sometidos a radiación gamma, que sobreexpresan NL1Tc presentan una tasa de proliferación mayor comparados con parásitos control (Olivares *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren fuertemente que NL1Tc participa de la reparación del daño al DNA en *T. cruzi*.

Estudios realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, del Dr. Norbel Galanti, en la facultad de Medicina de la Universidad de Chile, indican que la inhibición de la vía BER, utilizando el fármaco metoxiamina que impide el reconocimiento de los sitios AP por las endonucleasas AP, determina una disminución de la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, frente al daño al DNA provocado por ROS/RNS (Fernández, 2009). Estos resultados sugieren que en ambas formas celulares debería expresarse alguna endonucleasa AP. En el genoma de *T. cruzi* se identificó la secuencia de TcAP1, homóloga a la endonucleasa AP de humano (APE1). Mediante ensayos de complementación se determinó que TcAP1 confiere resistencia frente a agentes oxidantes cuando es expresada en cepas de *E. coli* carentes de exonucleasa III, la principal endonucleasa AP en esta bacteria (Pérez *et al.*, 1999). Sin embargo, sólo ha sido posible determinar la expresión de la proteína TcAP1 en la forma epimastigota de *T. cruzi*, y no en formas amastigotas y tripomastigotas. Esto último sugiere la participación de otra

endonucleasa AP en la vía BER de *T. cruzi*, fundamentalmente en estas últimas formas parasitarias.

En este trabajo, utilizando técnicas convencionales, se clonará y expresará en bacterias *E. coli* el gen que codifica para la endonucleasa transposónica NL1 de *T. cruzi* y posteriormente se confirmará su pertinencia por secuenciación aminoacídica. Una vez obtenida la proteína recombinante, se preparará un suero policlonal, el cual será utilizado para reconocer dicha proteína en homogeneizados de proteínas totales en las tres formas celulares del parásito y en epimastigotes tratados con H₂O₂.

3. HIPÓTESIS

La endonucleasa transposónica apurínica/apirimidínica NL1Tc se expresa en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar sobre la participación de la endonucleasa apurínica/apirimidínica NL1Tc en respuesta a estrés oxidativo en *T. cruzi* cepa Dm28c.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1 Clonar el gen que codifica para la proteína NL1Tc completa y transfectarlo a un vector de expresión.

4.1.2 Obtener la proteína recombinante NL1Tc completa. Identificarla por secuenciación aminoacídica.

4.1.3 Generar un anticuerpo policlonal anti-NL1Tc molécula completa.

4.1.4 Determinar el nivel de expresión de NL1Tc en las formas celulares epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

4.1.5 Estimar el nivel de expresión de NL1Tc frente a estrés oxidativo, en epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 AMPLIFICAR EL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA NL1Tc E INSERTARLO EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS PROCARIONTES.

5.1.1 Amplificación de la secuencia codificante para la proteína NL1Tc

Basados en análisis bioinformáticos realizados previamente, se identificó la región codificante para la endonucleasa AP NL1 de *T. cruzi* (NL1Tc, genbank accesion nro. 602092, cepa Tulahuén) (Martin *et al.*, 1995). Utilizando dicha secuencia se generaron oligonucleótidos partidores específicos para el gen NL1Tc, con fragmentos nucleotídicos 5' y sitios de restricción para las enzimas y Kpn I (en rojo) Hind III (en azul), como se muestra a continuación:

- Forward NL1Tc: 5'-GGGGTACCATGGAGCCATTTACATGGCTG-3'
- Back NL1Tc: 5'-CCCAAGCTTTATAAGCGCTCTCGTGAAAGC-3'

Utilizando como molde DNA genómico de *T. cruzi*, se amplificó la secuencia codificante de la proteína NL1Tc mediante la técnica de PCR. Para esta reacción se utilizaron 25 ul totales de reacción, agregando 2 ul de DNA molde, MgCl₂ 3 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1.5 U de DNA Taq polimerasa Platinum[®] (Invitrogen) y 16 pmol de cada partidor. Los ciclos termales fueron: 5 minutos de denaturación a 95°C, seguidos de 20

ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. Posteriormente se aplicaron 20 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 72°C. La extensión final fue de 5 minutos a 72°C. El tamaño esperado de la región amplificada corresponde aproximadamente a 984 pares de bases. La visualización de estos fragmentos se realizó mediante geles de agarosa al 1% p/v, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml).

5.1.2 Purificación del amplificado a partir de geles de agarosa

Los amplificados de NL1Tc fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1% utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.1.3 Digestión del amplificado y del vector de expresión con enzimas de restricción

Los fragmentos amplificados y purificados del gen NL1Tc y el vector de expresión pQE[®]-80L (Qiagen) fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Hind* III durante 5 horas a 37°C. El vector pQE[®]-80L genera una proteína de fusión de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína.

5.1.4 Ligación del amplificado al vector de expresión

Para la ligación del producto de PCR de NL1Tc en el vector de expresión pQE[®]-80L (previamente digeridos como se indicó en 1.3) se realizó una incubación con DNA ligasa T₄ (Promega) (0,3 U/μl) en presencia de ATP 1 mM, durante toda la noche a 4°C.

5.1.5 Precipitación del DNA ligado

El constructo pQE80L-NL1Tc generado en 1.4, fue precipitado por la adición de 1 μl de glicógeno (20 ng/ml), 2 μl de NaAc 3M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol 100%. La mezcla se dejó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se sometió a centrifugación a 15.000 x g por 10 minutos y fue resuspendido en agua libre de nucleasas.

5.1.6 Transformación de células electrocompetentes *E. coli* BL21 pLys E

Mediante electroporación se transformaron bacterias *E. coli* (DE3) BL21 pLys E con el constructo pQE80L-NL1Tc. Para ello se mezclaron 50 μl de bacterias electrocompetentes con 3 μl de DNA del constructo en cubetas de electroporación de 0,1 mm de distancia de los electrodos (Biorad). Se aplicó un pulso de 1,8 volts a la reacción, utilizando un electroporador MicroPulser[®] (Biorad). Posteriormente las bacterias fueron incubadas en 700 μl de medio LB durante 1 hora a 37°C con agitación. En forma paralela, se prepararon placas de medio LB agar sólido con 120 μg/ml de ampicilina, las cuales

fueron utilizadas para sembrar las bacterias electroporadas, usando un volumen de 50 y 200 μ l por placa. Estos cultivos fueron mantenidos en estufa de incubación durante toda la noche a 37°C.

5.1.7 Selección de colonias positivas

Se escogieron colonias al azar obtenidas de los cultivos de bacterias transformadas con el inserto pQE80L-NL1Tc. Para corroborar la presencia del constructo en cada una de ellas, se aplicó la técnica de PCR de colonias utilizando los mismos partidores señalados en el punto 1.1. La visualización de los fragmentos de cada clon se realizó en geles de agarosa 1% p/v y teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml).

5.1.8 Purificación y secuenciación de constructos

Las colonias que resultaron positivas a la prueba de PCR de colonias, fueron incubadas en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C. Posteriormente se purificó el plasmidio pQE80L-NL1Tc utilizando el kit Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se corroboró la presencia del inserto en el marco de lectura correcto mediante secuenciación automática de DNA en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA de la Facultad de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

5.2 OBTENER LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NL1Tc COMPLETA. IDENTIFICARLA POR SECUENCIACIÓN AMINOACÍDICA.

5.2.1 Inducción de la expresión de NL1Tc

La cepa *E. coli* BL21 pLys E transformada con el constructo pQE80L-NL1Tc fue inducida a expresar la proteína recombinante NL1Tc. Para tales propósitos, se sembraron bacterias transformadas en 500 ml de medio líquido LB con ampicilina. El cultivo se incubó a 37°C en agitación orbital a 200 rpm hasta alcanzar una DO₅₉₅ de 0,6 a 0,8. Luego, se adicionó IPTG 1 mM como inductor de la expresión de la proteína recombinante, incubándose nuevamente en agitación orbital durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 4.900 x g durante 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 ml de buffer de lisis denaturante B (GuHCl 6M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M pH 8,0). Posteriormente, la suspensión fue sonicada durante 3 minutos y el lisado obtenido, fue centrifugado a 6.300 x g por 20 minutos a 4°C, obteniendo así un sobrenadante enriquecido con la proteína NL1Tc recombinante fusionada a una cola de 6 histidinas. Finalmente, se corroboró la expresión de la proteína mediante separación electroforética en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, (Laemmli, 1970) y posteriores ensayos de “Western Blot” utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti poli-histidina (Biotech), en una dilución de 1:5000 en PBS-Tween 0,05% v/v. Las bandas fueron visualizadas utilizando un anticuerpo secundario anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina, en una dilución 1:7000 en PBS-Tween 0,05% v/v (Jackson ImmunoResearch) y los sustratos colorimétricos NBT/Bcip[®] (Promega).

5.2.2 Purificación de la proteína recombinante NL1Tc

A partir del sobrenadante enriquecido con la proteína de interés, se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad en columnas de níquel, que permite retener proteínas de fusión a una cola de histidinas. De esta forma, 1 ml de resina Ni-NTA (Invitrogen) fue equilibrada con 10 volúmenes de buffer B (GuHCl 6 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M pH 8,0), cargada con el sobrenadante obtenido en el punto anterior, conteniendo la proteína recombinante de interés y lavada posteriormente con 40 ml de tampón C (8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01M Tris pH 6,3). La elusión de las proteínas retenidas en la columna se realizó con tampón E (úrea 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M pH 4,5) tomando alícuotas secuenciales de 500 µl cada una.

5.2.3 Identificación de la proteína NL1Tc recombinante purificada

La identificación de las NL1Tc recombinante purificada se realizó mediante separación electroforética en geles SDS-PAGE y posteriores ensayos de Western blot, de la misma forma que en 2.2

5.2.4 Identificación de la proteína NL1Tc mediante espectrometría de masa

Las bandas de NL1Tc recombinante, identificadas mediante electroforesis y ensayos de Western blot, fueron obtenidas desde geles de acrilamida. Su identidad fue corroborada mediante espectrometría de masa MalDI-ToF. Este procedimiento fue llevado a cabo por el Dr. Ulf Hellman, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Suecia.

5.3 GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-NL1Tc.

5.3.1 Inmunización de ratones Balb/c y obtención de sangrías inmunes.

La inmunización de ratones Balb/c con la proteína NL1Tc recombinante, así como la posterior obtención de sueros hiperinmunes se realizó en colaboración con el Centro Biotecnológico Veterinario (BIOVETEC), del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se utilizaron dos grupos experimentales de ratones Balb/c de 4 a 6 semanas de edad, con 2 ratones cada grupo. Ambos grupos fueron inoculados en forma subcutánea, a nivel de la base de la cola, con 100 μ l de la proteína recombinante a una concentración de 100 μ g/ml. En el primer grupo se utilizó coadyuvante Quitosano, que es un polisacárido de bajo peso molecular al 1% (LMW 97 kDa) (Marón *et al.*, 2007; Zaharoff *et al.*, 2007) en ácido acético 0,5%. El segundo fue inmunizado con NL1Tc recombinante asociada a

coadyuvante completo de Freund. Previo a la inoculación, se sangraron todos los ratones con la finalidad de obtener el suero preinmune. Las sangrías se realizaron los días 1, 15, 30 y 45. En ambos grupos se aplicó una segunda inmunización luego de 30 días.

5.3.2 Determinación de los niveles de anticuerpos anti-NL1Tc presentes en las diferentes sangrías

Una vez obtenidas las sangrías, se determinó el nivel de anticuerpos anti-NL1Tc presentes en los sueros de los ratones inmunizados. Para tales efectos, se realizó un ensayo de ELISA de tipo indirecto; placas de 96 pocillos (Nunc) fueron incubadas con 50 µl de la proteína NL1Tc recombinante en tampón de recubrimiento (0,15 M Na₂CO₃, 0,35 M NaHCO₃, pH 9,6) a una concentración de 40 µg/ml, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó un bloqueo con 200 µl de solución de albumina bovina (BSA) al 3% durante la noche a 4°C, seguido de una incubación con los sueros hiperinmunes obtenidos en 3.1 en una concentración de 1:250 v/v en solución BSA al 0,1%, durante 2 horas a 37°C. La placa fue lavada 5 veces con PBS-Tween 0,05% v/v e incubada con 100 µl por pocillo con el anticuerpo secundario anti-IgG, anti-IgG1 y anti-IgG2a conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1/10.000 v/v en BSA 0,1%, por 45 minutos a 37°C. Finalmente, la reacción fue revelada utilizando el sustrato tetrametil bencidina (TMB) y analizada en un lector de ELISA a una densidad óptica de 450 nm.

5.4 DETERMINACIÓN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE NL1Tc EN LAS FORMAS CELULARES EPIMASTIGOTES, AMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES DE LA CEPA Dm28c DE *T. cruzi*.

5.4.1 Cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*

El cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) se realizó en medio Diamond (Diamond, 1968) (NaCl 106 mM, KH₂PO₄ 29 mM, K₂HPO 23 mM, triptosa 12,5 g/l, triptona 12,5 g/l, extracto de levadura 12,5 g/l, pH 7,2) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), hemina 75µM y antibióticos (penicilina 75 U/ml y estreptomycin 75 µg/ml), mantenidos a 28°C, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Dr. Norbel Galanti, en la facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.4.2 Cultivos celulares

Líneas celulares de macrófagos de ratón Raw 264.7, fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con SFB inactivado al 5% y antibióticos (penicilina 75U/ml y estreptomycin 75 µg/ml) a 37°C, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Dr. Norbel Galanti, en la facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.4.3 Obtención de la forma infectiva (tripomastigotes) y formas replicativas intracelulares (amastigotes) de *T. cruzi*

Para la obtención de la forma celular tripomastigote, se infectaron células Raw 264.7 en semiconfluencia con tripomastigotes en una relación 1:3 obtenidos desde cultivos celulares previamente infectados, durante 24 horas a 37°C, tras lo cual se reemplazó por medio fresco. Luego de 4 a 5 días de crecimiento, los tripomastigotes liberados al medio fueron colectados desde el sobrenadante. Por otra parte, para la obtención de amastigotes la infección del cultivo celular se realizó en células Raw 264.7 con 85% de confluencia utilizando un alto número de parásitos, en una relación célula: tripomastigotes de 1:6. Debido a la alta carga parasitaria recibida, luego de 3 a 4 días se genera lisis del cultivo de células Raw 264.7, previo a la diferenciación a tripomastigotes, liberándose de esta forma amastigotes al medio.

5.4.4 Preparación de homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes

Una vez obtenidas las diferentes formas celulares a partir de los cultivos mencionados en los puntos anteriores se procedió a preparar homogeneizados de proteínas totales. Para tales efectos, 1×10^7 epimastigotes, tripomastigotes o amastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi* fueron resuspendidos en 100 μ l de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8,0, SDS 1% p/v en presencia de inhibidores de proteasas: 5 mM PMSF, 2,5 mM TPCK, 5 μ g/ μ l aprotinina, 1 mM EDTA). Los extractos fueron sometidos a sonicación

almacenados a -20°C . Finalmente se determinó la concentración de proteínas totales presentes en cada homogeneizado utilizando el kit BCATM Protein Assay Kit (Pierce), según las indicaciones del fabricante.

5.4.5 Determinación de los niveles de expresión de NL1Tc

Para la determinación de los niveles de expresión de NL1Tc en las diferentes formas celulares de *T. cruzi* se utilizaron 60 μg de proteínas totales de cada forma celular, las que fueron separadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 8%. Posteriormente se realizaron ensayos de Western blot utilizando como anticuerpo primario el suero pre inmune (como control) y el suero hiperinmune de ratón anti-NL1Tc obtenidos en 3.1, ambos en una dilución de 1:2000 en PBS-Tween 0,05% v/v. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo anti ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) utilizando una dilución de 1:5000 en PBS-Tween 0,05% v/v. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

5.5 ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE NL1Tc FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO, EN EPIMASTIGOTES DE LA CEPA Dm28c DE *T. cruzi*.

Cultivos axénicos de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, cepa Dm28c (obtenidos según se señala en el punto 4.1), fueron contabilizados utilizando una

cámara de Neubauer, para obtener alícuotas con una concentración final de 12 millones de parásitos/ml. Cada una de estas fracciones fue resuspendida en medio Diamond fresco con 10% de SFB inactivado y tratadas con H₂O₂ 200 µM en diferentes tiempos de incubación a 27°C (0, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas). Luego, las alícuotas fueron centrifugadas a 1200 x g durante 10 minutos y resuspendidas en 100 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8,0, SDS 1% p/v en presencia de inhibidores de proteasas: 5 mM PMSF, 2,5 mM TPCK, 5 µg/µl aprotinina, 1 mM EDTA). Las muestras fueron sonicadas y congeladas. La concentración de proteínas totales fue determinada utilizando el kit BCATM Protein Assay (Pierce). Posteriormente, 70 ug de proteínas totales fueron separadas mediante electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE al 8% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Mediante la técnica de Western Blot se determinó el nivel de expresión de la proteína NL1Tc en los homogeneizados de epimastigotes tratados y no tratados con H₂O₂, utilizando el mismo procedimiento descrito en 4.5. Posteriormente la membrana fue sometida a tratamiento con una solución de 1,5 gr de glicina; 0,1 gr de SDS; 1 ml de Tween 20 ajustado a pH 2,2 durante 30 minutos con el propósito de eliminar los anticuerpos unidos a ella. Finalmente, la membrana fue incubada con un anticuerpo primario monoclonal anti α -tubulina en una dilución de 1:10.000 en PBS-Tween 0,05% v/v, y anticuerpos secundarios anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:5.000 en PBS-Tween 0,05% v/v, como control de carga de proteínas. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante

6. RESULTADOS

6.1 CLONAMIENTO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA NL1Tc COMPLETA Y TRANSFECCIÓN EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN.

Debido a que NL1Tc presenta actividad endonucleasa AP, se procedió a caracterizar y comparar esta proteína con endonucleasas AP de *Homo sapiens* (APE1; GenBank accession AAH08145) y de *T. cruzi* (TcAP1; GenBank accession 4704309). Mediante el uso del programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) se realizó un alineamiento múltiple (figura 5), determinándose un bajo porcentaje de identidad de NL1Tc (GenBank accession 602092) en relación a APE1 y TcAP1 (16,59% y 12,56, respectivamente). Sin embargo, se pueden observar que algunos residuos presentes en la región catalítica de estas endonucleasas AP son conservados por NL1Tc (figura 5, residuos en rojo) lo que podría explicar la actividad de esta proteína. En verde se destacan residuos importantes para la actividad DNasa I descrito para NL1Tc (Olivares *et al.*, 1997).

Posteriormente, utilizando el programa Phyre Version 0.2 (Imperial College of Science Technology and Medicine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/phyre/>), se realizó un modelamiento computacional por homología en 3 dimensiones de la proteína NL1Tc (figura 6) (basado en la cristalografía de APE1 de *H. sapiens*). De esta forma, se logró establecer que existe similitud con otras proteínas similares y que existe un 16% de identidad con la proteína APE1 de humanos. Además se observó que ambas proteínas

poseen similitud en la distribución de α -hélices y láminas β , sugiriendo que NL1Tc podría tener una función similar a la APE1 de humanos o a su homóloga TcAP1 en *T. cruzi* en la reparación del DNA cuando es sometido a estrés oxidativo.

Se diseñaron partidores específicos (figura 7) para amplificar la secuencia nucleotídica codificante para NL1Tc mediante la técnica de PCR, a partir de DNA genómico de *T. cruzi*. En cada extremo 5' de los partidores se agregó secuencias nucleotídicas, para su posterior digestión con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Hind* III, que dirigen la inserción del fragmento en el vector de expresión pQE[®]-80L (QIAGEN), que genera una proteína de fusión con 6 residuos de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína recombinante.

En la figura 8 se muestran los amplificados de DNA de NL1Tc (tamaño del amplificado de 984 pb) en geles de agarosa 1% p/v en buffer TBE 1x pH 8,0 y teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) (carril 3). La ausencia de amplificado en el control sin DNA (carril 2) indica la especificidad de los partidores y la ausencia de contaminación con DNA.

Los fragmentos de DNA que codifican NL1Tc fueron purificados y sometidos a digestión con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Hind* III, de la misma forma que el vector de expresión pQE[®]-80L. Posteriormente, utilizando ligasa de fago T4 el fragmento de NL1Tc fue insertado en el vector de expresión, obteniéndose el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc. La inserción del gen codificante para NL1Tc en el vector fue observada mediante digestión del constructo con las enzimas *Kpn* I y *Hind* III y posterior liberación del inserto, así como mediante la técnica de PCR de colonias, utilizando los mismos partidores sobre el

constructo como DNA molde (figura 9). Adicionalmente, pQE[®]-80L-NL1Tc fue analizado mediante secuenciación automática de DNA para corroborar el correcto marco de lectura (figura 10). Finalmente, bacterias electrocompetentes *E.coli* (DE3) BL21 pLys E fueron transformadas con el constructo e inducidas con 1 mM IPTG para expresar la proteína de fusión NL1Tc con una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal.

6.2 OBTENECIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NL1Tc COMPLETA. IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN AMINOACÍDICA.

Con la finalidad corroborar la expresión e identificar la proteína NL1Tc, se generaron homogeneizados de proteínas totales de bacterias transformadas con pQE[®]-80L-NL1Tc, inducidas y no inducidas con 1mM de IPTG. La expresión de NL1Tc recombinante fue observada mediante separación electroforética en geles SDS-PAGE 12% (figura 11A) y ensayos de Western Blot (figura 11B) utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-histidina (Biotech) y anticuerpos secundarios anti ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Promega). El revelado se realizó mediante la adición de los sustratos NBT/Bcip[®] (Promega). De esta forma, en homogeneizados de bacterias *E. coli* (DE3) BL21 pLys E transformadas con el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc, en presencia de 1mM de IPTG se comprobó la presencia de una banda de aproximadamente 36 kDa (carril 6, enmarcado en rojo), concordante con el tamaño esperado para NL1Tc. La especificidad de la técnica se demostró por la ausencia de reconocimiento de bandas en el ensayo de Western blot en los carriles correspondientes a homogeneizados de bacterias sin plasmidio (carril 2), homogeneizados de bacterias con el vector pQE[®]-80L vacío sin adición de IPTG (carril 3),

homogeneizados de bacterias transformadas con el vector pQE[®]-80L vacío en presencia de 1mM de IPTG (carril 4) y homogeneizados de bacterias transformadas con el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc sin adición de 1mM de IPTG (carril 5).

Luego de obtenida la purificación de la proteína NL1Tc recombinante, se tomaron las alícuotas purificadas para ser analizadas mediante separación electroforética en geles SDS-PAGE al 12% (figura 12A) y ensayos de Western Blot (figura 12B), utilizando anticuerpos anti histidina (Biotech) como anticuerpo primario, y anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. De este modo se seleccionaron aquellas fracciones que presentaron la mayor concentración de la proteína NL1Tc (flecha roja) y la menor cantidad de contaminación por proteínas bacterianas retenidas inespecíficamente en la columna de níquel. Estas fueron las alícuotas representadas en los carriles 3, 4 y 5, correspondientes a las eluciones 6, 9 y 12 respectivamente.

Una vez obtenidos los resultados de la identificación peptídica, mediante la técnica de espectrometría de masa MALDI-TOF, en el laboratorio del Dr. Ulf Hellman, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Suecia, se corroboró la identidad de la proteína. En la figura 13A se muestra la secuencia de 4 péptidos obtenidos mediante esta técnica. En la figura 13B se muestra un alineamiento entre los 4 péptidos en relación a la secuencia aminoacídica esperada para NL1Tc que corrobora la identidad de la proteína recombinante.

6.3 GENERACIÓN DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-NL1Tc MOLÉCULA COMPLETA.

Para identificar la proteína y determinar los niveles relativos de expresión de NL1Tc frente a estrés oxidativo en las diferentes formas celulares de *T. cruzi*, se procedió, en primer lugar, a desarrollar un anticuerpo específico contra esta proteína. El suero preinmune de cada ratón se utilizó como control negativo de los sueros hiperinmunes. Los sueros obtenidos luego de la inoculación fueron utilizados como inmunógenos primarios en un ensayo de ELISA indirecto (figura 14), con el objetivo de cuantificar los niveles de anticuerpos anti NL1Tc presentes ambos grupos. Las muestras de suero, fueron tomadas el día 1 (inoculación y 1° sangría), día 15 (2° sangría) y día 30 (3° sangría). Como anticuerpo secundario se utilizó anti IgGs totales, IgG1 e IgG2a para el ratón de grupo 1 y anti IgG totales para los ratones del grupo 2. Claramente se aprecia que, a partir del día 15 post-inoculación, el suero del ratón del grupo 1 presenta altos niveles de IgGs totales, IgG1 e IgG2a contra la proteína NL1Tc (barras verdes). Contrariamente, los sueros de ambos ratones del grupo 2 (barras en rojo) presentan un menor nivel de IgGs totales anti NL1Tc. En vista de los resultados obtenidos, se decidió utilizar el suero inmune proveniente de la sangría del día 45 de los ratones del grupo 1 para la ejecución de los objetivos específicos 4 y 5.

6.4 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE NL1Tc EN LAS FORMAS CELULARES EPIMASTIGOTES, AMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES DE LA CEPA Dm28c DE *T. cruzi*.

En la figura 15 se muestra el resultado correspondiente al ensayo de Western Blot, utilizando como anticuerpo primario el suero preinmune como control (figura 15A) y el suero inmune anti NL1Tc (figura 15B) sobre extractos de proteínas totales de amastigotes (carril 1), tripomastigotes (carril 2) y epimastigotes (carril 3). Ambos sueros se utilizaron en dilución de 1:4000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) en dilución de 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Al realizar la incubación de la membrana de nitrocelulosa con el suero inmune anti NL1T se observa la presencia de una banda de masa molecular de aproximadamente 36 kDa en los carriles correspondientes a los extractos de las 3 formas celulares de *T. cruzi*. No se detectó esta banda al utilizar el suero preinmune. Con esto se puede concluir que la proteína NL1Tc de *T. cruzi* se expresa en las tres formas parasitarias y es posible detectarla específicamente mediante este ensayo utilizando el suero inmune anti NL1Tc generado previamente.

6.5 ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE NL1Tc FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO, EN EPIMASTIGOTES DE LA CEPA Dm28c DE *T. cruzi*.

En la figura 16 se muestra un ensayo de Western Blot realizado sobre extractos de proteínas totales de epimastigotes previamente incubados con 200 μM de H_2O_2 en diferentes tiempos. Como anticuerpo primario se utilizó el suero inmune anti NL1Tc en una dilución de 1:4000 v/v en PBS-Tween 0,05% y como secundario un anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano en dilución de 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. En el carril 1 se encuentra el control de parásitos sin tratamiento con H_2O_2 , mientras que en los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se muestran los extractos de proteínas totales de epimastigotes sometidos a 200 μM de H_2O_2 durante 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, respectivamente. Como control de carga de proteínas, la misma membrana fue sometida a una eliminación de los anticuerpos secundarios (“stripping”) e incubada con un anticuerpo primario monoclonal anti α -tubulina de ratón en una dilución de 1:10000 v/v en PBS-Tween 0,05% y anticuerpos secundarios anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Aplicando este método, no fue posible observar diferencias en el nivel de expresión de NL1Tc en epimastigotes sometidos a estrés oxidativo en los diferentes intervalos de tiempo, que pudieran dar cuenta de su participación en la reparación del daño oxidativo al DNA.

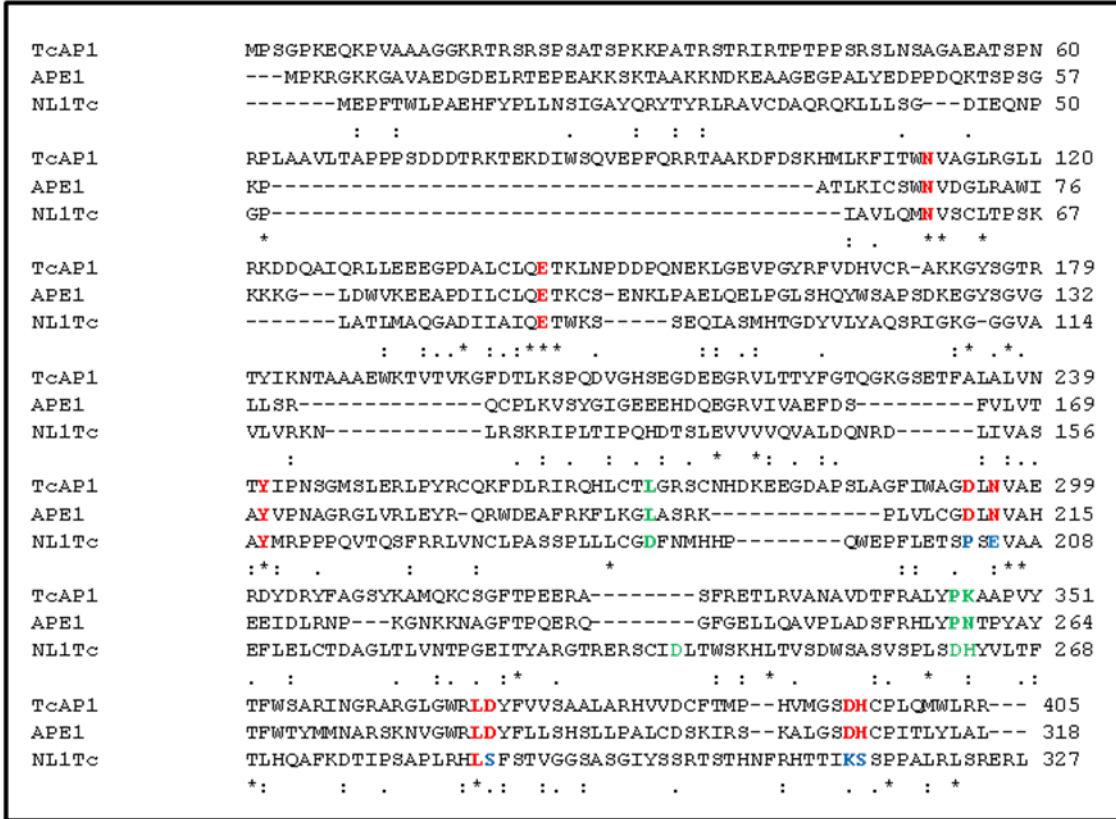


Figura 5.- Alineamiento de la proteína NL1Tc con endonucleasas AP de *Trypanosoma cruzi* (TcAP1) y *Homo sapiens* (APE1). Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TcAP1 (*T. cruzi*) y APE1 (*H. sapiens*) con NL1Tc (*T. cruzi*). En color rojo se muestran los aminoácidos de la región catalítica, fundamentales para la actividad AP endonucleasa, compartidos entre TcAP1, APE1 y NL1Tc. En color azul se muestran los aminoácidos de la región catalítica que no son compartidos por NL1Tc. En color verde se aprecian los residuos críticos para actividad endonucleasa de retrotransposones (Feng *et al.*, 1996).

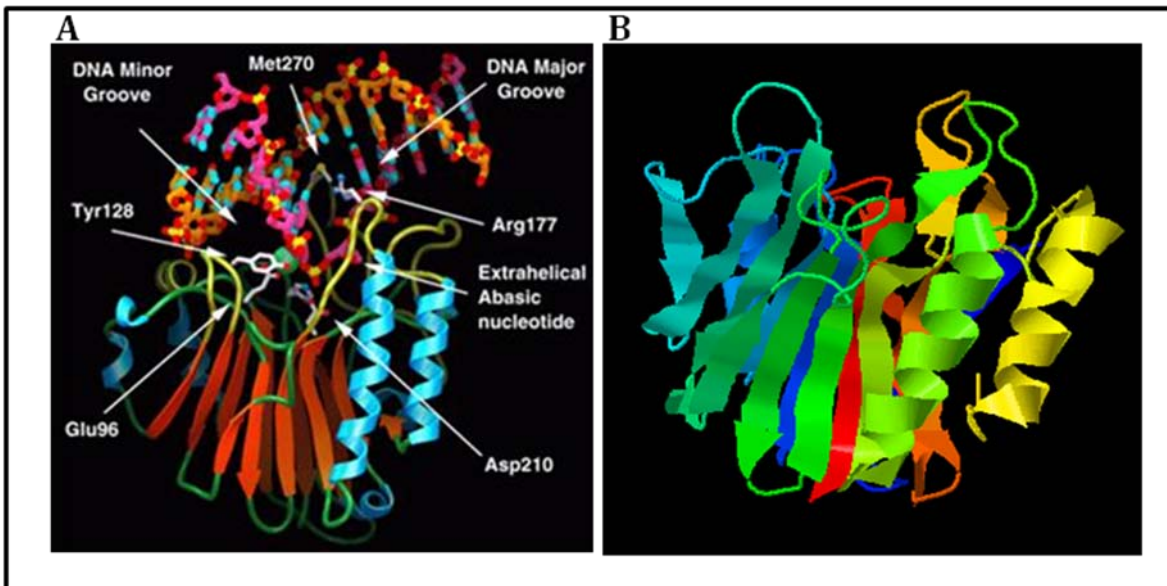


Figura 6.- Comparación de modelos tridimensionales de NL1Tc de *Trypanosoma cruzi* y APE1 de *Homo sapiens*. Para el modelamiento en tres dimensiones de NL1Tc se utilizó el programa Phyre Version 0.2 (Imperial College of Science Technology and Medicine) y los resultados de cristalografía de APE1 de *H. sapiens* . A) APE1 de *H. sapiens*; B) NL1Tc.

```
>gi|602092:247-1230 Trypanosoma cruzi mRNA for Non-LTR retrotransposon
AP endonuclease
ATGGAGCCATTTACATGGCTGCCCCGGGAGCATTCTATCCGCTGCTGAATTCATCGGGCCTTATCAGC
GCTATACATACCGTTTTCGCGTCCGTATGTGACGCGCAACGACAAAAGCTACTGCTAAGCGGAGACATTGA
GCAGAACCCAGGCCCATAGCAGTACTCCAGATGAACGTTTCTTGCCTCACGCCGTCAAACTCGCAACA
TTAATGGCGCAAGGAGCAGACATAATAGCCATTCAGGAGACTTGGAAAGTCGTCAGAGCAGATCGCCAGCA
TGCACACTGGAGATTATGTGCTCTATGCACAGTCGCGCATCGGCAAGGGAGGCGGTGTGGCGGTGCTGGT
GCGGAAAAATCTCCGCTCCAAGCGTATACCTCTCACCATCCCCCAGCACGACACCAGCCTTGAAGTGGTG
GTGGTCCAGGTTGCTCTGGACCAGAACCGTGATCTTATTGTAGCGAGTGCCTATATGAGACCACCACCGC
AAGTAACGCAATCCTTCAGGCGTTAGTAAACTCCTTCCAGCCTCGTCGCCGCTCCTGCTGTGCGGGGA
TTTCAACATGCATCACCACAGTGGGAGCCATTCTTGGAGACTTCTCCAAGCGAGGTTGCTGCAGAAATTT
TTAGAACTGTGCACGGATGCGGGACTCACCTTGGTTAACACCCCTGGTGAGATCAGGTATGCCCGTGGCA
CAAGAGAACGATCCTGTATCGATCTGACATGGTCAAAGCATTGTGACTGTGTCGGATTGGTCAGCTTCCGT
GTCGCCGCTTAGTGATCATTATGTGCTGACATTTACGCTGCATCAGGCATTTAAGGATACCATACCTTCG
GCACCCCTTCGGCACCTAAGTTTTTCTACAGTTGGGGGAAGTGCAAGTGGGATTTATTCATCAAGGACTT
CGACGCACAACCTCCGGCATAAGACTATAAAAAGCAGTCCACCGGCATTAAGGCTTTCACGAGAGCGCTT
ATAA
```

Figura 7.- Secuencia nucleotídica codificante para la endonucleasa NL1Tc. En color rojo se pueden apreciar los sitios de alineamiento de los partidores utilizados para clonar el gen.

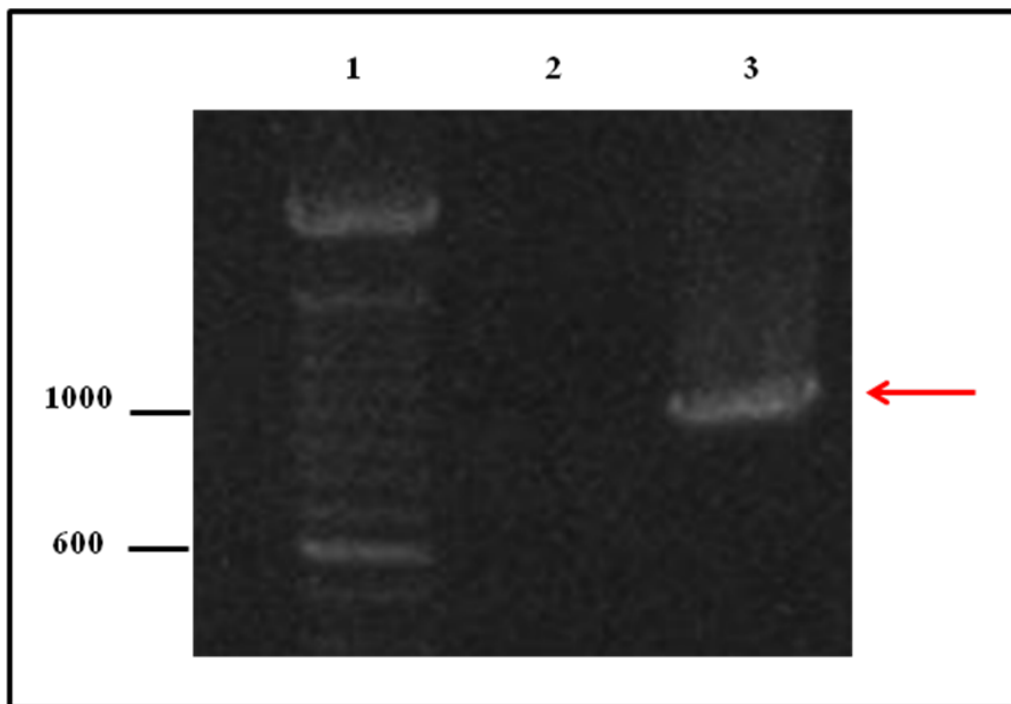


Figura 8.- Amplificados de dna del gen codificante para NL1Tc de *T. cruzi*. Separación electroforética de fragmentos de DNA obtenidos por PCR en geles de agarosa al 1% p/v en TBE 1x pH 8,0 teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Estándar de peso molecular (100 pares de bases por banda); Carril 2: Control sin DNA; Carril 3 amplificado de DNA codificantes para NL1Tc, utilizando DNA genómico de *T. cruzi* como DNA molde (tamaño esperado del amplificado de 984 pb ←).

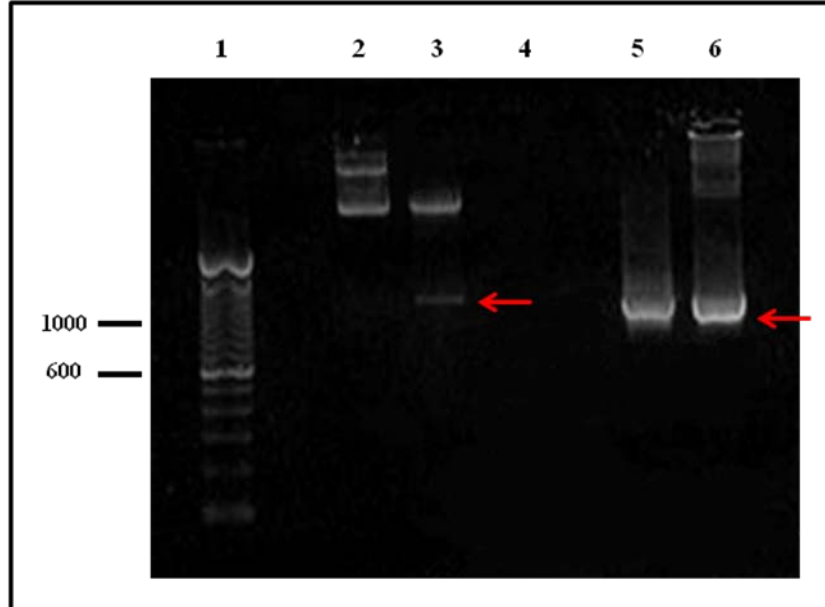


Figura 9.- Detección del inserto de dna codificante para NL1Tc en el vector pQE[®]-80L. Detección del fragmento de DNA codificante para NL1Tc en el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc mediante liberación del inserto desde el constructo mediante digestión enzimática con las enzimas *KpnI* y *HindIII* y PCR de colonias. Carril 1: Estándar de peso molecular (100 pares de bases por banda); Carril 2: Constructo pQE[®]-80L-NL1Tc sin digerir; Carril 3: Liberación del fragmento NL1Tc (984 pb) desde el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII*; Carril 4: Control negativo de la técnica de PCR sin DNA molde; Carril 5: Amplificado de DNA codificante para NL1Tc a partir de DNA genómico de *T. cruzi* como molde; Carril 6: Amplificado de DNA codificante para NL1Tc utilizando lisados de bacterias con el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc como DNA molde (tamaño del amplificado de 984 pb). La flecha señala la marca correspondiente al DNA codificante para NL1Tc.


```

Seq      CATGATCAGATCACTGAGGACGAGAGATCATGTAGATCGCTCACATCACATCACGATCGC 60
L1      -----

Seq      AGGCGAGTCGGTACCATGGAGCCATT-ACATGGCTGCCGCTGAGCGATTTCTATCCGCTG 119
L1      -----ATG GAGCCATTACATGGCTGCCCGCGGAGCATTCTATCCGCTG 45
          ***** *
Seq      CTGA-TTCCATCG-CGCT-ATCAG-GCTACACATACCGTT-GCGTGCGGTATGTGACG-G 173
L1      CTGAATCCATCGGCGCTTATCAGCGCTATACATACCGTTTGGTGCCGTATGTGACGCG 105
          **** ***** *
Seq      CA-CGACAAA-GCTACTGCTAAGCGGAGACATTGAGCA--ACCCAGGGCCACAGCAGTA 229
L1      CAACGACAAAAGCTACTGCTAAGCGGAGACATTGAGCAGAACCAGGCCCCATAGCAGTA 165
          ** *****
Seq      CTCCAGATGAACGTTTCTTGCCCTCAGCCCGTCAAA-CTCGCA-CATTACTGCC--AGGA 285
L1      CTCCAGATGAACGTTTCTTGCCCTCAGCCCGTCAAAACTCGCAACATTAATGGCGCAAGGA 225
          *****
Seq      GCAAACATA-TAGCCATT CAGGAGACTTG--AGTCGTCTGAGCA-ATCGCCAGCATGCAC 341
L1      GCAGACATAATAGCCATT CAGGAGACTTGGAAGTCGTCAGAGCAGATCGCCAGCATGCAC 285
          *** *****
Seq      ACTGTAGATCATGTGCTC-ATGCACAGTCGCGCATCGGCAAGGGAGCGGTGTGGCGGTG 398
L1      ACTGGAGATTATGTGCTCTATGCACAGTCGCGCATCGGCAAGGGAGCGGTGTGGCGGTG 345
          ***** **
Seq      CTGATGCGCAAG--CTCTCGCTCTA-GCGTATACGTCTCACA--TCCCCAGCATGACAC- 452
L1      CTGGTGCGGAAAAATCTCCGCTCCAAGCGTATACCTCTCACCATCCCCAGCAGCAGACACC 405
          *** *****

```

Figura 10.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para NL1Tc y el producto de la secuenciación automática del constructo pQE[®]-80L-NL1Tc. Alineamiento realizado entre la secuencia esperada para el gen codificante de NL1Tc y la secuencia obtenida del constructo pQE[®]-80L-NL1Tc, utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para NL1Tc (GenBank accession 602092). **L1:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pQE[®]-80L-NL1Tc.

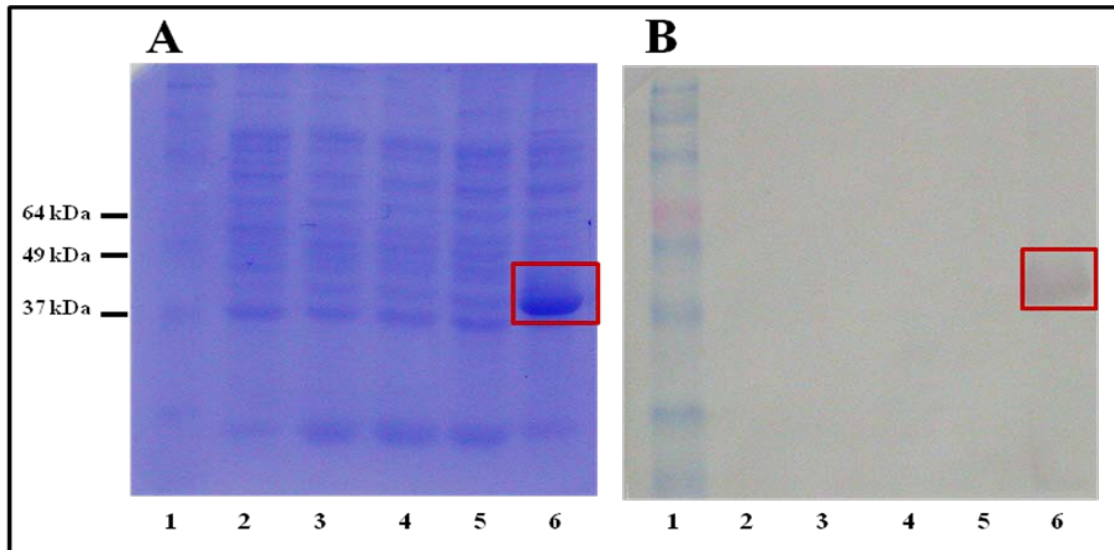


Figura 11.- Identificación de la proteína recombinante NL1Tc en homogeneizados de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLys E transformadas con el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc. **A:** SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. **B:** *Western Blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti histidina (Biotech) y anticuerpo secundario anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Promega). El revelado se realizó usando los sustratos *NBT/Bcip*[®] (Promega). La detección de la proteína de un tamaño esperado de aproximadamente 36 kDa se encuentra señalada dentro de un cuadro de color rojo. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa (BenchMark[™], Invitrogen); Carril 2: Homogeneizados de proteínas de *E. coli* BL21 pLys E; Carril 3: Homogeneizados de proteínas de *E. coli* BL21 pLys E con el vector pQE[®]-80L, sin adición de IPTG; Carril 4: Homogeneizados de proteínas de *E. coli* BL21 pLys E con el vector pQE[®]-80L, en presencia de IPTG 1mM; Carril 5: Homogeneizados de proteínas de *E. coli* BL21 pLys E con el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc, sin adición de IPTG; Carril 6: Homogeneizados de proteínas de *E. coli* BL21 pLys E con el constructo pQE[®]-80L-NL1Tc, en presencia de IPTG 1mM.

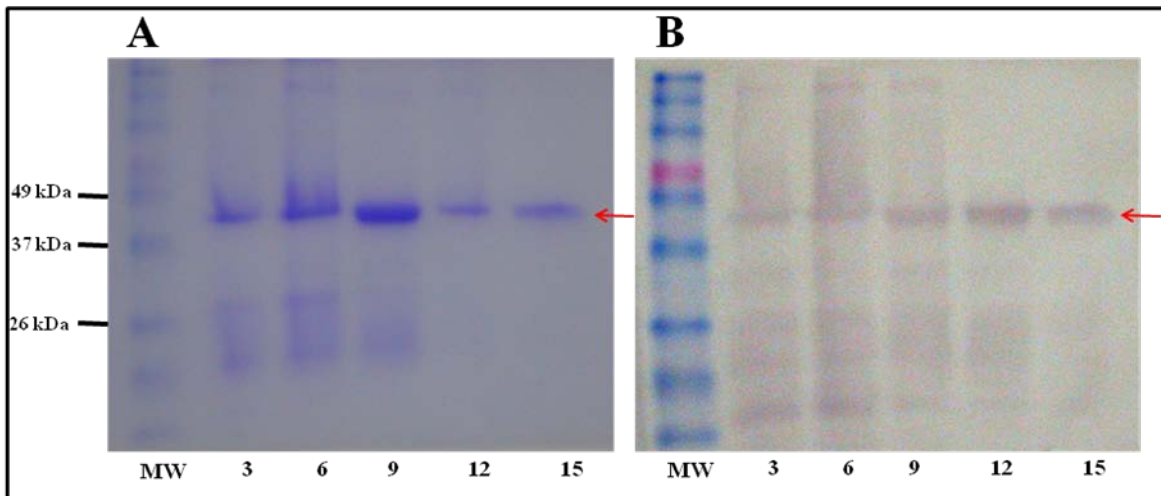


Figura 12.- Identificación de la proteína recombinante NL1Tc purificada. A: SDS-PAGE al 12%, proteínas teñidas con azul de Coomasie. **B:** *Western Blot* utilizando como anticuerpo primario monoclonal anti histidina (Biotech) y anticuerpo secundario anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Promega). El revelado se logra mediante la adición de los sustratos *NBT/Bcip*[®] (Promega). **MW:** Marcador de peso molecular (BenchmarkTM, Invitrogen). 3, 6, 9, 12 y 15 corresponden al número de elución desde la columna de níquel. Tamaño esperado de la proteína 36 kDa aproximadamente. La flecha señala la marca correspondiente a la proteína NL1Tc recombinante.

A

LATLMAQGADIIAIQETWK
 GGGVAVLVR
 DLIVASAYMRPPPQVTQSFRR
 SCIDLTVSKHLTVSDWSASVSP LSDHYVLTFTLHQAFK

B

NL1Tc	MEPFTWLP AEHFYPL LNSIGAYQRYTYRLRAVCDAQRQKL LLSGD IEQNP GPIAVLQMNV	60
MaldiTof	-----	
NL1Tc	SCLTP SKLATLMAQGADIIAIQETWKSSEQ IASMHTGDYVLYAQSRIGKGGGVAVLVRKN	120
MaldiTof	----- LATLMAQGADIIAIQETWK----- GGGVAVLVR-----	28
	*****	*****
NL1Tc	LRSKRIP LTI PQHDT SLEV VVQVALDQMRDLIVASAYMRPPPQVTQSFRR L V NCLPASS	180
MaldiTof	----- DLIVASAYMRPPPQVTQSFRR-----	48

NL1Tc	PLLLC GDFNMHHPQWEPFLETSPSEVAAEFLELCTDAGLTLVNTPG EITYARGTRERSCI	240
MaldiTof	----- SCI	51

NL1Tc	DLTWSKHLTVSDWSASVSP LSDHYVLTFTLHQAFKDTIP SAPLRHLSFSTVGG S ASGIYS	300
MaldiTof	DLTWSKHLTVSDWSASVSP LSDHYVLTFTLHQAFK-----	86

NL1Tc	SRTSTH NFRHTTIKS SPPALRLSRERL	327
MaldiTof	-----	

Figura 13.- Identificación de NL1Tc recombinante mediante espectrometría de masa.

Identificación de péptidos de la proteína NL1Tc recombinante mediante la técnica de espectrometría de masa Mal di-ToF, previo tratamiento de la proteína con tripsina. **A:**

Secuencia de péptidos de NL1Tc recombinante, identificados por espectrometría de masa.

B: Alineamiento de péptidos obtenidos por espectrometría de masa con la secuencia aminoacídica esperada para NL1Tc, utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

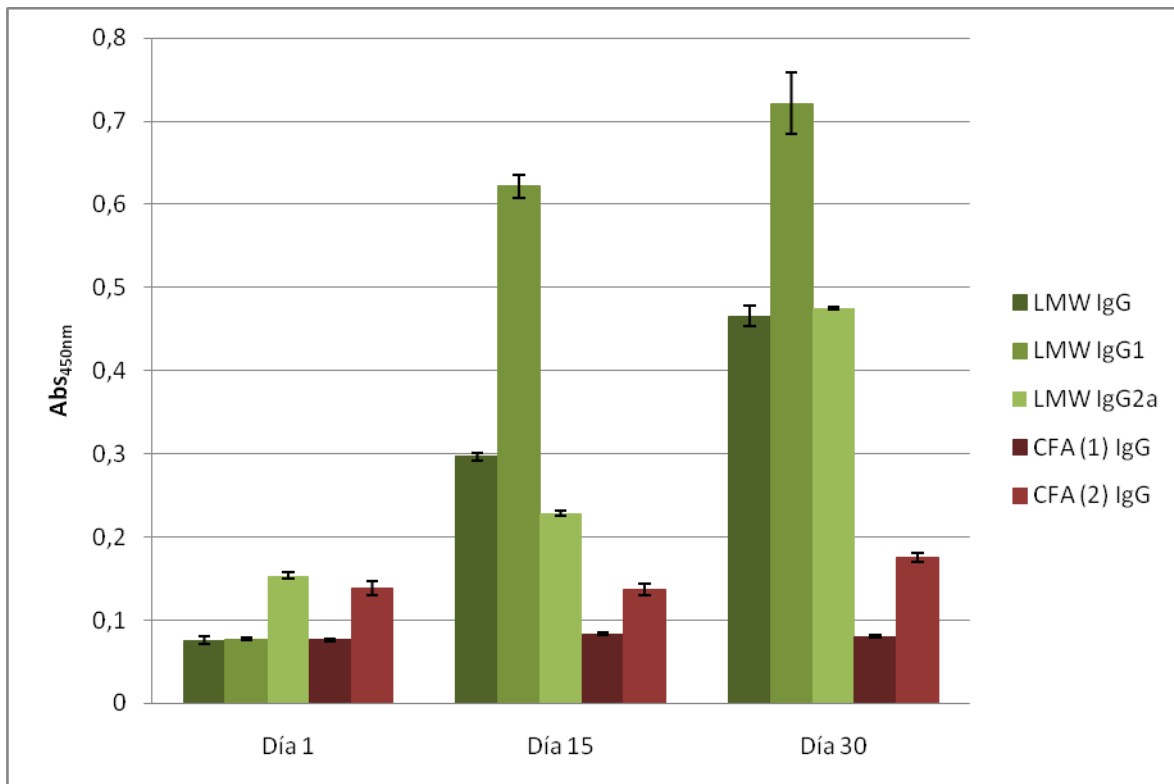


Figura 14.- Cuantificación de niveles de anticuerpos anti-NL1Tc en sueros de ratones inmunizados. Cuantificación de los niveles de anticuerpos anti NL1Tc presentes en el suero de ratones al día 1 (inoculación y 1° sangría), día 15 (2° sangría) y día 30 (3° sangría), mediante ensayos de ELISA indirectos. Barras en verde: IgG totales, IgG1 e IgG2a de ratón inoculado con NL1Tc más quitosano como adyuvante. Barras en rojo: IgG totales de dos ratones inoculados con NL1Tc más coadyuvante de Freund.

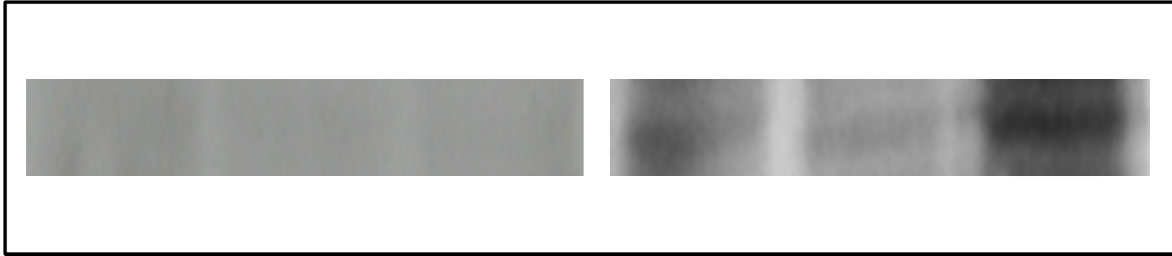


Figura 15.- Detección de la proteína NL1Tc en homogeneizados de proteínas totales de amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*. **A:** Ensayo de *Western Blot* utilizando como anticuerpo primario el suero pre inmune de ratón en una dilución 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05% y como anticuerpo secundario, un anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución de 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. **B:** Ensayo de *Western Blot* utilizando como anticuerpo primario el suero inmune anti NL1Tc de ratón en una dilución 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05% y como anticuerpo secundario, un anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución de 1:5000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Carril 1: Homogeneizados de proteínas totales de amastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*; Carril 2: Homogeneizados de proteínas totales de tripomastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*; Carril 3: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*. El revelado fue realizado mediante quimioluminiscencia utilizando el kit *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific).

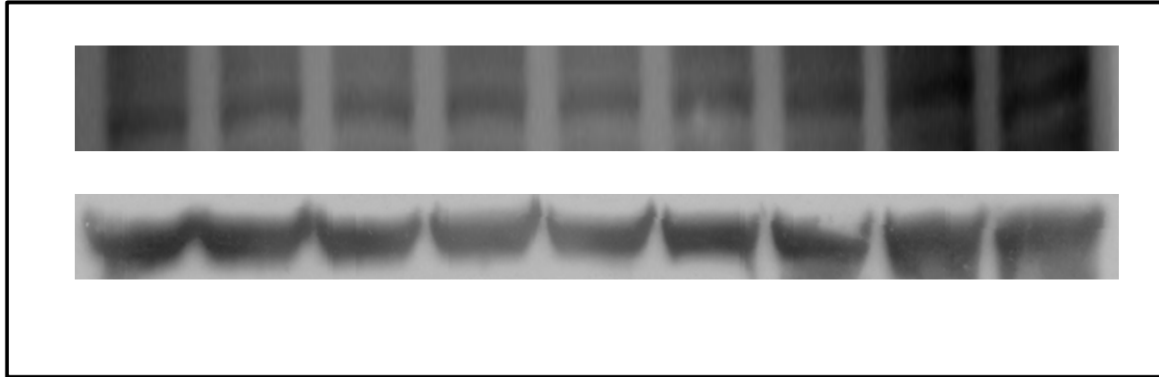


Figura 16.- Niveles de expresión de la proteína NL1Tc en extractos proteicos de epimastigotes tratados durante diferentes tiempos con H₂O₂ 200 µM.

A: *Western blot* utilizando como anticuerpo primario el suero inmune anti NL1Tc en una dilución 1:4000 v/v en PBS-Tween 0,05% y anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución de 1:5000 v/v en PBS/Tween 0,05%. **B:** Control de carga de proteína utilizando como anticuerpo primario monoclonal anti α -tubulina en una dilución de 1:10.000 v/v en PBS-Tween 0,05% y anticuerpos secundarios anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:5.000 v/v en PBS-Tween 0,05%. En ambos casos el revelado se realizó utilizando el kit *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific). Carril 1: homogeneizado de epimastigotes sin tratamiento con H₂O₂. Carriles 2 al 9: homogenizados de epimastigotes tratados con H₂O₂ durante 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas, respectivamente.

7. DISCUSIÓN

La actividad endonucleasa AP fue inicialmente descrita para dos proteínas de *E. coli*: exonucleasa III y endonucleasa IV, codificadas por los genes *xth* y *nfo* respectivamente (White *et al.*, 1976; Cunningham *et al.*, 1986). Más del 90% de la actividad AP endonucleasa de *E. coli* es atribuible a la exonucleasa III, mientras que el restante 10% estaría relacionado a la endonucleasa IV. El rol biológico que presenta la actividad AP endonucleasa de la exonucleasa III en la reparación del daño oxidativo al DNA, quedó de manifiesto luego de que fueran identificadas bacterias *E. coli* mutantes para el gen *xth* altamente sensibles a H₂O₂ (Demple *et al.*, 1983). A su vez, se ha descrito la presencia de dos endonucleasas AP en el eucarionte ancestral *Saccharomyces cerevisiae*, APN1 y APN2. Sin embargo, a diferencia de lo observado para *E. coli*, APN1, homóloga de la endonucleasa IV de bacterias, es la principal endonucleasa AP en esta levadura (Demple y Harrison, 1994). En el caso de mamíferos, como *H. sapiens* y *Mus musculus*, sólo se ha podido establecer la existencia de endonucleasas AP homólogas a la exonucleasa III de *E. coli* (APE1 y APE2), siendo de vital importancia la expresión de APE1 para la reparación del DNA y la supervivencia celular (Marenstein *et al.*, 2004; Burkovics *et al.*, 2009).

En *T. cruzi* se ha descrito el gen codificante para la proteína TcAP1 (homólogo a la exonucleasa III de *E. coli*), así como su actividad endonucleasa AP en ensayos de complementación en *E. coli* carentes del gen *xth* (Pérez *et al.*, 1999). En estudios recientes realizados por Fernández (2009), se generaron anticuerpos policlonales a partir de un

fragmento polipeptídico correspondiente al extremo carboxilo-terminal de TcAP1, con el objetivo de detectar la expresión de esta proteína en las tres formas celulares de *T. cruzi*. Sin embargo, utilizando este anticuerpo en ensayos de Western blot sobre homogeneizados totales de amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes, sólo fue posible detectar la presencia de una banda de masa molecular correspondiente con TcAP1 en la forma epimastigota. Este resultado sugiere la participación de otra endonucleasa AP de *T. cruzi* en la reparación del DNA, fundamentalmente en las formas amastigotas y tripomastigotas.

Existe evidencia que indica que elementos móviles transponibles de tipo LINEs de *T. cruzi* (L1Tc) y *H. sapiens* (L1) poseen actividad endonucleasa que sería común a todos los retrotransposones no sitio específicos, sugiriendo que estos retroelementos endógenos tendrían un rol en los procesos de reparación del DNA (Olivares *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha visto que la endonucleasa codificada por el ORF1 de L1Tc, llamada NL1Tc, tiene su homólogo en la endonucleasa que se expresa en la región amino terminal del ORF2 de L1. Sin embargo, si bien la endonucleasa presente en el elemento L1 de humanos muestra actividad hidrolítica, no presenta predilección por los sitios AP, al contrario de lo descrito para NL1Tc (Feng *et al.*, 1996; Olivares *et al.*, 1997; Olivares *et al.*, 1999). Es interesante destacar que, a nivel filogenético, el elemento L1 de humanos se encuentra en la misma rama divergente y más cercano en evolución a la familia de las AP endonucleasas. En cambio el elemento L1 de *T. cruzi* (L1Tc) se encuentra situado en una rama divergente distinta a la señalada anteriormente. A pesar de ello, esta proteína retrotransposónica posee características de endonucleasa AP (Olivares *et al.*, 1997).

Se ha reportado que la secuencia aminoacídica de NL1Tc muestra una alta homología (mayor al 65%) con los dominios considerados críticos de los sitios activos de la exonucleasa III, así como un 30% de identidad con respecto a la secuencia de consenso de la familia de las endonucleasas AP (Olivares *et al.*, 1997; Olivares *et al.*, 1999). Debido a esto, no resulta extraño que NL1Tc sea capaz de hidrolizar un fragmento de doble hebra de DNA que contiene un sitio AP interno y fragmentar plasmidios superenrollados que contienen este tipo de sitios (Feng *et al.*, 1996; Finnegan, 1997; Olivares *et al.*, 1999; Olivares *et al.*, 2003). Por otra parte, estudios *in vivo* demostraron el potencial rol biológico de la proteína NL1Tc, ya que ésta confiere viabilidad por complementación en bacterias *E. coli* mutantes carentes de exonucleasa III (Olivares *et al.*, 1997). Además, utilizando un vector de expresión específico para *T. cruzi* se logró la sobreexpresión de la proteína NL1Tc en epimastigotes, evidenciándose una reducción de 60% del daño al DNA en parásitos sometidos a tratamientos con el agente antineoplásico daunorubicina. Igualmente, epimastigotes sometidos a radiación gamma, que sobreexpresan esta proteína, presentan una tasa de proliferación mayor comparados con parásitos control (Olivares *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren fuertemente que NL1Tc participa de la reparación del daño al DNA en *T. cruzi*.

Con estos antecedentes, se decidió clonar en el vector de expresión pQE[®]-80L, la secuencia génica que codifica para la proteína NL1Tc. Posteriormente se amplificó el constructo en bacterias, las que fueron inducidas a expresar la NL1Tc. La proteína recombinante obtenida se identificó mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF) en el laboratorio del Dr. Ulf Hellman, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Suecia.

Esto aseguró que la proteína con la cual se trabajó era la correcta, y por lo tanto, podía ser inoculada en condiciones experimentales para la producción de un suero inmune.

Con el objetivo de detectar NL1Tc en las diferentes formas celulares del parásito, inicialmente se inocularon conejos con la proteína NL1Tc recombinante purificada de bacterias, para la obtención de un suero inmune. Al respecto, indagaciones realizadas por Olivares *et al.*, (2003) demuestran que es posible detectar la proteína NL1Tc en epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. Sin embargo, hasta la fecha no existen datos respecto a la expresión de esta proteína en las formas celulares de amastigote y tripomastigote. Así, alícuotas de la proteína NL1Tc fueron asociadas a coadyuvante de Freund completo y en los posteriores refuerzos con coadyuvante de Freund incompleto. Sin embargo, los títulos de anticuerpos detectados en los sueros de los conejos fueron insuficientes, razón por la cual se decidió aplicar otro modelo experimental. Bajo estas condiciones, se inoculó la proteína recombinante asociada con adyuvante de Freund completo e incompleto a ratones Balb/c de entre 4 a 6 semanas de edad. Los resultados fueron similares a los obtenidos para conejos, lo que sugiere una baja inmunogenicidad de NL1Tc. Finalmente, se optó por utilizar Quitosano, polisacárido de bajo peso molecular (~ 97 kDa) como adyuvante, el que ha demostrado conferir mayor inmunogenicidad que el coadyuvante de Freund (Marón *et al.*, 2007; Zaharoff *et al.*, 2007). Inmunizando ratones con NL1Tc recombinante asociada a este polisacárido, se obtuvo un suero inmune con niveles de anticuerpos capaces de detectar a NL1Tc en homogeneizados de proteínas totales de las tres formas celulares de *T. cruzi* (amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes), mediante ensayos Western blot. Este resultado sugiere que NL1Tc estaría cumpliendo la función de TcAP1 en las estas formas parasitarias para proteger a *T. cruzi* frente al daño

oxidativo que se produce en su DNA cuando ingresa al hospedero mamífero. Por esta razón, podemos decir que se cumple el objetivo principal de esta memoria, ya que se demuestra la expresión de la endonucleasa transposónica apurínica/apirimidínica en las tres formas celulares de *T. cruzi*.

En relación a la expresión y actividad de las AP endonucleasas frente a agentes genotóxicos, investigaciones realizadas por Fung *et al.*, (2001), indican que tratamientos con agentes que dañan el DNA inducen una mayor expresión de APE1 en fibroblastos de ratón NIH3T3. Se realizaron ensayos de Western blot con el objetivo detectar una posible sobreexpresión de la proteína NL1Tc en epimastigotes sometidos a diferentes tiempos de incubación con H₂O₂ 200 μM. Aplicando esta metodología, no fue posible observar un incremento en la expresión de NL1Tc en esta forma parasitaria. Sin embargo, no se puede descartar que NL1Tc se sobreexprese en epimastigotes al utilizar concentraciones mayores de H₂O₂, así como tampoco que se sobreexprese frente a estrés oxidativo en amastigotes y tripomastigotes, donde no fue posible detectar la expresión de TcAP1 (Fernández, 2009). En consecuencia de lo anterior, no se puede descartar la participación de NL1Tc en la reparación del daño oxidativo del DNA en epimastigotes, tal como se ha establecido al utilizar daunorubicina y radiación gamma como agentes genotóxicos (Olivares *et al.*, 2003). La confirmación de la participación de NL1Tc en la resistencia frente al daño oxidativo del DNA como la principal AP endonucleasa en la vía BER de tripomastigotes y amastigotes hace posible el inicio de la búsqueda de posibles inhibidores con el objetivo de establecer nuevas terapias contra la enfermedad de Chagas.

La confirmación de la presencia de NL1Tc en las tres formas celulares de *T. cruzi*, demostrada en esta Memoria, hace posible estudiar su participación en la resistencia al daño oxidativo del DNA en este parásito. Es particularmente importante la presencia de la enzima de reparación en la forma infectiva (tripomastigote) y replicativa intracelular (amastigote) de *T. cruzi*, hecho que sugiere que NL1Tc podría ser una de las enzimas principales en la vía de reparación por escisión de bases en este parásito, cuando es sometido a daño oxidativo.

8. CONCLUSIONES

- Se confirma, a nivel de microsecuenciación aminoacídica y modelamiento molecular, la presencia de la enzima de reparación del DNA NL1Tc en *T. cruzi*.
- La proteína NL1Tc se expresa en las tres formas celulares de *T. cruzi* a diferencia de TcAP1 que sólo se expresaría en la forma epimastigota del parásito.
- En las condiciones experimentales empleadas, no se observa sobre expresión de NL1Tc frente a estrés oxidativo. Sin embargo, este resultado no descarta la participación de esta enzima en la reparación del DNA.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.** 2002. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science. 4 ed. New York, USA.
- **ANDRADE, L.; ANDREWS N.** 2005. The *Trypanosoma cruzi* host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. Doi:10.1038/nrmicro1249.
- **ANÓN.** 2006. Chagas' disease. [en línea] OIE <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_american.pdf> [consulta: 28-04-09].
- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infect*. 25(3): 190-193.
- **ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H.** 2001. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 115(2): 189-198.
- **BALLA, J.; VERCELLOTTI, G. M.; JENEY, V.; YACHIE, A.; VARGA, Z.; EATON, J. W.; BALLA, G.** 2005. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res*. 49(11): 1030-1043.
- **BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.** 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*. 3(8-9): 1109-1115.
- **BRINGAUD, F.; GHEDIN, E.; EL-SAYED, N.; PAPADOPOULOU, B.** 2008. Role of transposable elements in trypanosomatids. *Microbes and Infection*. 10(6): 575-581.

- **BURKOVICS, P.; HAJDU, I.; SZUKACSOV, V.; UNK, I.; HARACSKA, L.** 2009. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 37(13): 4247-4255.

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

- **CAVALIER-SMITH.** 1993. T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* (4): 953-994.

- **CEVALLOS, A.; HERNÁNDEZ, R.** 2001. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). [en línea] cap 15. **In:** Microbios en línea. <<http://www.biblioweb.dgsc.unam.mx/libros/microbios/Cap15/>> Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. México. [consulta: 25 de julio de 2010].

- **CHAGAS, C.** 1909. Neue Trypanosomen. *Arch. Schiffs Tropenhyg.* 13: 120-122.

- **CUNNINGHAM, R. P.; SAPORITO, S. M.; SPITZER, S. G.; WEISS, B.** 1986. Endonuclease IV (nfo) mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 168(3): 1120-1127.

- **COURA, J.R.** 2007. Chagas disease: What is know and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 Suppl 1:113-22.

- **DE OLIVEIRA, T. B.; PEDROSA, R.; WILHELM, D.** 2006. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol.* 116(3): 357-363.

- **DE SOUZA, W.** 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current Pharmaceutical Design. 8(4): 269-285.
- **DEMPLE, B.; HARRISON, L.** 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annu Rev Biochem. 63: 915-948.
- **DEMPLE, B.; HALBROOK, J.; LINN, S.** 1983. Escherichia coli xth mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide. J Bacteriol. 2: 1079-1082.
- **DIAMOND, L. S.** 1968. Improved method for the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 and E.Histolytica-like amebae with trypanosomatids. J Parasitol. 54: 715-719.
- **DI NOIA, J.; BUSCAGLIA, C.; DE MARCHI, C.; ALMEIDA, I.; FRASCH, A.** 2002. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence tha Chagas' disease is due to a single parasite lineage. J Exp Med. 195(4): 401-413.
- **ELIAS, M.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S.** 2001. Transcription rate modulation through the life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. Mol Biochem Parasitol. 112(1): 79-90.
- **FENG, Q.; MORAN, J.; KAZAZIAN JR., H.; BOEKE, J.** 1996. Human L1 Retrotransposon Encodes a Conserved Endonuclease Requiered for Retrotransposition. Cell. 29; 87(5): 905-916.
- **FERNÁNDEZ, C.** 2009. Incremento de la citotoxicidad al daño oxidativo del DNA en *Trypanosoma cruzi* mediante la inhibición de la vía BER. Tesis para optar al título de Bioquímico y grado de Magíster en Bioquímica. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina. 86 p.

- **FINNEGAN, D. J.** 1997. How non-LTR retrotransposons do it. *Curr. Biol.* 7(4).
- **FISHEL, M.; KELLEY, M.** 2007. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol Aspects Med.* 28(3-4): 375-395.
- **FREITAS, J.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S.; MACEDO, A.** 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 35(4): 411-417.
- **FUNG, H.; BENNETT, R.A.; DEMPLE, B.** 2001. Key role of a downstream specificity protein 1 site in cell cycle-regulated transcription of the AP endonuclease gene APE1/APEX in NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 45: 42011-42017.
- **GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P.** 2010. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50: 323-354.
- **GRAÇA-SOUZA, A. V.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G. O.; BRAZ, G. R.; PAES, M. C.; SORGINE, M. H.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.** 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol.* 36(4): 322-335.
- **GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J.** 2009. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009:190354.
- **HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219(1): 1-14.
- **HAZRA, T.; DAS, A.; DAS, S.; CHOUDHURY, S.; KOW, Y.; ROY, R.** 2007. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective. *DNA Repair.* 6(4): 470-480.

- **HEGDE, M. L.; HAZRA, T.K.; MITRA, S.** 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18(1): 27-47.

- **HERAS, S.; LÓPEZ, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. L.; MARTIN, S.; THOMAS, M. C.** 2005. The L1Tc C-Terminal Domain from *Trypanosoma cruzi* Non-Long Terminal Repeat Retrotransposon Codes for a Protein That Bears Two C₂H₂ Zinc Finger Motifs and Is Endowed with Nucleic Acid Chaperone Activity. *Mol Cell Biol.* 25(21): 9209-9220.

- **HOEIJMAKERS, J.H.** 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 411(6835): 366-374.

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

- **KAZAZIAN JR., H.** 2004. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science.* 303(5664): 1626-1632.

- **KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COOMBS, G. H.** 1999. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitol Today.* 15(10): 404-409.

- **KRIEGER, S.; SCHWARZ, W.; ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CLAYTON, C.** 2000. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol.* 35(3): 542-552.

- **LAEMMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15; 227(5259): 680-685.

- **LINDAHL, T.; WOOD, R. D.** 1999. Quality control by DNA repair. *Science*. 286(5446): 1897-1905.

- **LÓPEZ, M.C.; OLIVARES, M.; GONZÁLEZ, C.I.; MARTIN, F.; GARCÍA-PÉREZ, J.L.; THOMAS, M.C.** 1999. Elementos móviles: ¿Ventaja evolutiva o parasitismo molecular?. *Ars Pharmaceutica*, 40(1): 5-24.

- **LUKES, J.; HASHIMI, H.; ZÍKOVÁ, A.** 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*. 48(5): 277-299.

- **MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S.** 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 102(24): 3003-3008.

- **MANDAVILLI, B. S.; SANTOS, J. H.; VAN HOUTEN, B.** 2002. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*. 509(1-2): 127-151.

- **MARENSTEIN, D. R.; WILSON, D.M. 3rd.; TEEBOR, G. W.** 2004. Human AP endonuclease (APE1) demonstrates endonucleolytic activity against AP sites in single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)*. 3(5): 527-533.

- **MARÓN, L. B.; COVAS, C. P.; DA SILVEIRA, N. P.; POHLMANN, A.; MERTINS, O.; TATSUO, L. N.; SANT'ANNA, O. A.; MORO, A. M.; TAKATA, C. S.; DE ARAUJO, P. S.; DA COSTA, M. H.** 2007. LUVs recovered with chitosan: A new preparation for vaccine delivery. *J Liposome Res*. 17(3-4): 155-163.

- **MARTIN, F.; MARANON, C.; OLIVARES, M.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M.** 1995. Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the ape family of DNA repair enzymes. *J Mol Biol.* 247(1): 49-59.

- **MARTIN, F.; OLIVARES, M.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M. C.** 1996. Do non-long terminal repeat retrotransposons have nuclease activity?. *Trends Biochem Sci.* 248. 283-285.

- **MANOEL-CAETANO, F.; SILVA, A.** 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 23(10): 2263-2274.

- **McCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z.; BUCK, G.** 1989. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* 82(1): 177-189.

- **MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2004. Decreto supremo N° 158. Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria. 22 de Octubre de 2004. 6p.

- **MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2007. Boletín de Vigilancia en Salud Pública de Chile. 10(25).

- **OLEA, A.** 2009. Zoonosis y Enfermedades de transmisión vectorial. Boletín de Vigilancia en Salud Pública. 10 N° 25 ISSN 0717 – 392p.

- **OLIVARES, M.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M.C.** 1997. The open reading frame 1 of the L1Tc retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* codes for a protein with apurinic-apirimidinic nuclease activity. *J Biol Chem.* 272(40): 25224-25228.

- **OLIVARES, M.; THOMAS, M.C.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M.C.** 1999. The L1Tc long interspersed nucleotide element from *Trypanosoma cruzi*, encodes a protein with 3'- Phosphatase and 3'- Phosphodiesterase enzymatic activities. *J Biol Chem.* 274(34): 23883-23886.

- **OLIVARES, M.; LÓPEZ, M.C.; GARCÍA-PÉREZ, J.L.; BRIONES, P.; PULGAR, M.; THOMAS, M.C.** 2003. The endonuclease NL1Tc encoded by the LINE L1Tc from *Trypanosoma cruzi* protects parasites from daunorubicin DNA damage. *Biochim Biophys Acta (BBA).* 1626: 25-32.

- **OZA, S. L.; TETAUD, E.; ARIYANAYAGAM, M. R.; WARNON, S. S.; FAIRLAMB, A. H.** 2002. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 277(39): 35853-35861.

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

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

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

- **PIACENZA, L.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; RADI, R.** 2009. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol.* 12(4): 415-421.
- **PRATA, A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1(2): 92-100.
- **RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.** 2010. Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 375: 1388-1402.
- **RILEY, P. A.** 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiant Biol.* 65(1): 27-33.
- **ROBERTSON, A. B.; KLUNGLAND, A.; ROGNES, T.; LEIROS, I.** 2009. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* 66(6): 981-993.
- **SCHMUNIS, G.; YADON, Z.** 2009. Chagas disease: A Latin American Health problem becoming a world health problem. *Act Trop.* 2436:8.
- **SHACKELFORD, R.E.; KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S.** 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 28(9): 1387-1404.
- **SINZELLE, L.; IZSVÁK, Z.; IVIES, Z.** 2009. Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci.* 66: 1073-1093.
- **SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E.** 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 531(1-2): 231-251.

- **SPADILIERO, B.; SÁNCHEZ, F.; SLEZYNGER, T.; HENRÍQUEZ, D.** 2002. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem.* 84(4): 832-839.
- **TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N.** 2006. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(5).
- **TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-
BUCH, C.A.** 2008. Chagas disease. *Postgrad Med J.* 82:788-798.
- **TORO, G.C.; GALANTI, N.** 1988. H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Cell Res.* 174(1): 16-24.
- **TURRENS, J.F.** 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med.* 25(1-2): 211-220.
- **TYLER, K.; ENGMAN, D.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31(5-6): 472-481.
- **URBINA, J.; DOCAMPO, R.** 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19(11): 495-501.
- **VAZQUEZ, M.** 2007. Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi*. *Intl J Biomed Pharma Sci.* 1(1): 1-11.
- **WHITE, B. J.; HOCHHAUSER, S. J.; CINTRON, N. M.; WEISS, B.** 1976. Genetic mapping of xthA, the structural gene for exonuclease III in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 126(3): 1082-1088.

- **WHO EXPERT COMMITTEE.** 2002. <<http://www.who.int/tdr/htm>> [consulta: 07-06-10].

- **WHO-World Health Organization.** 2005. Report on Chagas' disease. <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf> [consulta: 07-06-10].

- **WILKINSON, S.R.; TEMPERTON, N. J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J. M.** 2000. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Biochem. 275(11): 8220-8225.

- **WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; BROMLEY, E. V.; MILES, M. A.; KELLY, J. M.** 2002a. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. J Biol Chem. 277(19): 17062-17071.

- **WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; TOUTHIA, S.; MAURICIO, I. L.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M.** 2002b. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. Biochem J. 364(Pt 3): 787-794.

- **WILKINSON, S.R.; KELLY, J. M.** 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. Biol Chem. 384(4): 517-525.

- **YOSHIDA, N.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitol Int. 57(2): 105-109.

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

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

- **ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W.; SCHLOM, J.; GREINER, J. W.** 2007. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine.* 25(11): 2085-2094.

- **ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L.** 2002. How protozoan parasites evade the immune. *Trends Parasitol.* 18(6): 272–278.

- **ZHANG, Q.; PAN, J.; ZHAO, CH.; WANG, Y.; JIA, Z.; ZHENG, R.** 2008. Non-enzymatic fast repair of DNA oxidative damage might also exist in cells. *Cell Biol Int.* Doi: 10.1016/j.cellbi.2008.01.291.

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

10. ANEXO 1



**UNIDAD DE PREVENCIÓN DE RIESGOS Y BIOSEGURIDAD
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

Santiago, June 17th 2008.-

To:
**FONDECYT PROGRAM
PRESENT**

Dear Sirs

The Risk Prevention and Biosafety Unit of the Faculty of Medicine, University of Chile hereby certifies that it received for its study, from responsible investigator, Professor Norbel Luis Galanti Garrone, the project proposal titled as "**Chagas' disease: Base Excision Repair (BER) pathway in the resistance of *Trypanosoma cruzi* to DNA damage caused by oxidative agents or antiparasitic treatments**", Cellular and Molecular biology Laboratory Cellular and Molecular biology Program, ICBM Faculty of Medicine, University of Chile, which satisfies all basic Biosafety requirements to be carried out. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1st edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2nd edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4th edition "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

Responsible investigator, Professor Norbel Luis Galanti Garrone, is committed to meet a biosafety standards established in the formerly cited manuals and those established in the Internal Regulations for the functioning of the Laboratories, Risk Prevention and Biosafety Unit Faculty of Medicine, University of Chile. Concomitantly he is responsibly for the proper complying of established biosafety regulations, of all participants of the aforementioned project.

Receiving acknowledgement: Professor Norbel Luis Galanti Garrone

**Professor Mónica Acuña Patzke
Risk Prevention and Biosafety Unit Director**

* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project

c.c.

- Dean, Doctor, Cecilia Sepúlveda C.
- Vice-Dean, Dr. Ennio Vivaldi
- Biomedical Sciences Institute Sub-Director ICBM, Dr. Benjamín Suárez
- Responsible Investigator, Professor Norbel Luis Galanti
- Archives

Av. Independencia 1027, Teléfono (56)-2 9786564, e-mail: biosegur@med.uchile.cl upr@med.uchile.cl