



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“CLONAMIENTO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS ENDONUCLEASAS
APURÍNICAS/APIRIMIDÍNICAS TcAP1 y TcAP2 DE *Trypanosoma cruzi* EN
CONDICIONES NATIVAS”

JOSÉ SEBASTIÁN DELGADILLO LIBERONA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUÍA: NORBEL GALANTI GARRONE

**SANTIAGO – CHILE
2011**

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

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

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

DEDICATORIA

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por haber apoyado siempre toda decisión que he tomado en mi vida, por su paciencia y aliento en los malos momentos, por siempre estar allí cuando la he necesitado. Le agradezco por el cariño y por las risas que la caracterizan, por su fortaleza que me enseñó a jamás rendirme ante la adversidad y a mantenerme en pie frente a cualquier desafío, por haberme entregado todo lo que he necesitado para convertirme en un hombre de bien. Las palabras se hacen pocas para poder decir todo lo que le agradezco y lo mucho que me enorgullece ser su hijo.

A mis amigos, los que han estado allí en las buenas y en las malas, los que han estado presentes a pesar de no vernos siempre, aquellos con los que he compartido incontables carcajadas y una que otra pena. De cada uno de ellos he aprendido cosas valiosas que han enriquecido tanto mi vida personal como profesional, pero sin duda alguna lo más valioso que me han entregado es su amistad.

Le agradezco a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por haberme entregado la mejor época de mi vida hasta ahora, por permitirme vivir tantos momentos de alegría, cuyos recuerdos siempre traen una sonrisa a mi rostro, y por haberme entregado la formación profesional de la cual me siento orgulloso.

Le agradezco al profesor Norbel Galanti por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio, pero principalmente agradezco el haber tenido la oportunidad de conocerlo y haber sido testigo de su calidad humana. A Gonzalo le agradezco el haber tenido la paciencia para enseñarme sobre biología celular y molecular, y por haber inculcado en mi la responsabilidad y perseverancia que debe tener un buen profesional. A la Sofy le agradezco de sobremanera la paciencia que tuvo para enseñarme todas las técnicas de laboratorio que requería saber para desarrollar mi tesis y por estar siempre dispuesta a ayudarme cuando lo necesitaba.

Al profesor Norbel, Gonzalo, Sofy, Naty, Lucia, Paula, Sole, Shago e Iván les agradezco la amistad que me han entregado, gracias a ella siempre recordaré mi paso por el laboratorio con alegría.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
FUENTES DE FINANCIAMIENTO.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	10
SUMMARY.....	12
1 – INTRODUCCIÓN.....	14
2 – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 – Epidemiología.....	14
2.2 – Etiología.....	16
2.3 – Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	17
2.4 – Signos clínicos y manifestaciones de la Enfermedad de Chagas.....	18
2.5 – Diagnóstico.....	20
2.6 – Tratamiento.....	20
2.7 – Estrés oxidativo y resistencia de <i>T. cruzi</i> frente especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	21
2.8 – Vía de reparación por escisión de bases (BER) y endonucleasas apurínicas/apirimidínicas (endonucleasas AP).....	22
2.9 – Expresión de proteínas recombinantes.....	25
3 – HIPÓTESIS.....	27
4 – OBJETIVO GENERAL.....	27
5 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6 – MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 – Obtención de secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i>	28
6.1a – Cultivo de epimastigotes y obtención de DNA genómico.....	28
6.1b – Amplificación de secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i>	28
6.1c – Purificación de los fragmentos amplificados desde los geles de agarosa.....	30

6.2 – Inserción de las secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i> en vectores de expresión pPICZ, pMT/V5 y pTREX y purificación de los constructos.....	30
6.3 – Incorporación de los constructos en células eucariontes.....	31
6.3a – Transfección estable de los constructos pPICZ- <i>TcAP1</i> y pPICZ- <i>TcAP2</i> en levaduras <i>P. pastoris</i> y pMT/V5- <i>TcAP1</i> y pMT/V5- <i>TcAP2</i> en células S2.....	31
6.3b – Transfección de epimastigotes con los constructos pTREX- <i>TcAP1-GFP</i> y pTREX- <i>TcAP2-GFP</i>	32
6.4 – Inducción de la expresión de las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i>	32
6.4a – Inducción en levaduras <i>P. pastoris</i>	32
6.4b – Inducción en células S2 de insecto.....	32
6.5 – Comprobación de la expresión de las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 en modelos de expresión de levaduras <i>P. pastoris</i> , células S2 de <i>D. melanogaster</i> y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	33
6.6 – Localización subcelular de las endonucleasas recombinantes TcAP1-GFP y TcAP2-GFP expresadas en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados.....	33
6.7 – Purificación en condiciones nativas de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP.....	34
6.7a – Obtención de homogenizados de proteínas totales a partir de epimastigotes expresando TcAP1-GFP.....	34
6.7b – Inmunoprecipitación de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP.....	34
6.7c – Comprobación de la purificación de TcAP1-GFP.....	35
7 – RESULTADOS	36
7.1 – Expresión de TcAP1 y TcAP2 recombinantes en levaduras <i>P. pastoris</i>	36
7.2 – Expresión de TcAP1 y TcAP2 recombinantes en células S2 de <i>D. melanogaster</i>	37
7.3 – Expresión de TcAP1-GFP y TcAP2-GFP en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	38
7.4 – Localización subcelular de TcAP1-GFP y TcAP2-GFP en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	39
7.5 – Purificación de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP.....	40
8 – DISCUSIÓN	63
9 – RESUMEN DE RESULTADOS	68
10 – CONCLUSIÓN	69

11 – BIBLIOGRAFÍA.....70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.- Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 2.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la endonucleasa AP de <i>Homo sapiens</i> (APE1) con las endonucleasas AP de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcAP1 y TcAP2).....	41
Figura 3.- Comparación de modelos tridimensionales de APE1 de <i>H. sapiens</i> con TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i>	42
Figura 4.- Fragmentos amplificados de DNA de las secuencias nucleotídicas codificantes para las endonucleasas AP TcAP1 (A) y TcAP2 (B) de <i>T. cruzi</i>	43
Figura 5.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP1 inserto en el vector pPICZ, mediante PCR de colonias.....	44
Figura 6.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP2 inserto en el vector pPICZ, mediante PCR de colonias.....	45
Figura 7.- Amplificados de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 (A) y TcAP2 (B) de <i>T. cruzi</i> , utilizando como DNA molde los constructos pPICZ- <i>TcAP1</i> y pPICZ- <i>TcAP2</i> purificados, respectivamente.....	46
Figura 8.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1 con el producto de la secuenciación automática del constructo pPICZ- <i>TcAP1</i>	47
Figura 9.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP2 con el producto de la secuenciación automática del constructo pPICZ- <i>TcAP2</i>	48
Figura 10.- Detección de amplificados del fragmento de DNA codificante para TcAP1 en <i>P. pastoris</i> transfectadas con el vector pPICZ- <i>TcAP1</i> , mediante PCR de colonias de levaduras.....	49
Figura 11.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP1 inserto en el vector pMT/V5, mediante PCR de colonias.....	50
Figura 12.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP2 inserto en el vector pMT/V5, mediante PCR de colonias.....	51
Figura 13.- Amplificados de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i> , utilizando como DNA molde los constructos pMT/V5- <i>TcAP1</i> y pMT/V5- <i>TcAP2</i> purificados, respectivamente.....	52
Figura 14.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1 con el producto de la secuenciación automática del constructo pMT/V5- <i>TcAP1</i>	53

Figura 15.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP2 con el producto de la secuenciación automática del constructo pMT/V5- <i>TcAP2</i>	54
Figura 16.- Detección de las proteínas recombinantes TcAP1 (A) y TcAP2 (B) en homogeneizados de proteínas totales de células S2 de <i>D. melanogaster</i> transfectadas con los constructos pMT/V5- <i>TcAP1</i> y pMT/V5- <i>TcAP2</i> , respectivamente.....	55
Figura 17.- Amplificados de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 de <i>T. cruzi</i> , utilizando como DNA molde los constructos pTREX- <i>TcAP1-GFP</i> y pTREX- <i>TcAP2-GFP</i> purificados, respectivamente.....	56
Figura 18.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1 con el producto de la secuenciación automática del constructo pTREX- <i>TcAP1-GFP</i>	57
Figura 19.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP2 con el producto de la secuenciación automática del constructo pTREX- <i>TcAP2-GFP</i>	58
Figura 20.- Expresión de las proteínas recombinantes TcAP1-GFP y TcAP2-GFP en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	59
Figura 21.- Detección de las endonucleasas AP recombinantes TcAP1-GFP (A) y TcAP2-GFP (B) en epimastigotes transfectados.....	60
Figura 22.- Localización subcelular de las endonucleasas AP recombinantes TcAP1 y TcAP2 en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados.....	61
Figura 23.- Detección de proteína de masa esperada para TcAP1-GFP en purificación por cromatografía de afinidad.....	62

RESUMEN

El agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es de carácter endémico en América Latina; 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 cuatro formas celulares; epimastigote, forma extracelular replicativa y no infectiva, tripomastigote metacíclico y tripomastigote sanguíneo, formas no replicativas e infectivas y amastigote, forma intracelular replicativa.

T. cruzi es capaz de sobrevivir al daño oxidativo del DNA generado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) producidas por su propio metabolismo, así como aquellas producidas en el intestino del insecto vector y en células del hospedero mamífero. Este daño sería reparado mediante la actividad de las endonucleasas apurínicas/apirimidínicas (endonucleasas AP) de la vía de escisión de bases (BER). *T. cruzi* presenta en su genoma secuencias que codificarían para endonucleasas AP, entre ellas TcAP1, homóloga de APE1 humana y TcAP2, homóloga de APE2 humana y de Apn2 de *Schizosaccharomyces pombe*. La expresión de estas proteínas podría ser fundamental para la sobrevivencia del parásito, tanto en el vector triatomino como en el hospedero mamífero.

Para un estudio sistemático de las características de estas enzimas, se requiere obtenerlas en el más alto grado de pureza desde el parásito o por técnicas de ingeniería genética. En esta Memoria de Título se clonaron las secuencias génicas que codifican para TcAP1 y TcAP2 en vectores de expresión para células eucariontes, lo que se confirmó mediante secuenciación automática de DNA. Con estos constructos se transfectaron células S2 de *Drosophila melanogaster*, levaduras *Pichia pastoris* y epimastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28c. Sorprendentemente, sólo fue posible expresar ambas endonucleasas en este último modelo.

La imposibilidad de expresar ambas endonucleasas AP en los modelos *P. pastoris* y *D. melanogaster* podría relacionarse a una variedad insuficiente o limitada de ciertos tRNAs, necesarios para la expresión de TcAP1 y TcAP2, con la consecuente disminución de la traducción de los mRNAs codificantes para ambos genes. Probablemente, los tRNAs que presentan anticodones específicos para la traducción de las endonucleasas AP de *T. cruzi* sólo se encuentran en concentraciones adecuadas en modelos celulares de expresión filogenéticamente cercanos a este protozooario.

Mediante cromatografía de afinidad se intentó purificar TcAP1-GFP a partir de homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados que expresaban esta proteína recombinante. Sin embargo no se logró obtener la proteína recombinante en condiciones nativas de forma pura. Se concluye que la utilización de GFP asociado como proteína de fusión a TcAP1 sólo permite la identificación de la proteína recombinante y no una purificación adecuada de la misma.

SUMMARY

The parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease or American Trypanosomiasis, an endemic pathology in Latin America, affecting about 10 to 15 million people with more than 75 million at risk. *T. cruzi* presents an indirect biological cycle and develops in four different cellular forms: epimastigote, extracellular, replicative and non-infective form; metacyclic trypomastigote and blood trypomastigote, non-replicative and infective forms and amastigote, intracellular and replicative form.

T. cruzi must resist the oxidative damage to its DNA exerted by oxygen and nitrogen free radicals (ROS/RNS) generated by its own metabolism, as well as those produced in the insect vector and in the mammalian host cells. Survival may be achieved by repair of the parasite DNA through apurinic/apyrimidinic endonuclease (AP endonuclease) activity of the base excision repair pathway (BER). We have identified two genomic nucleotide coding sequences of *T. cruzi* AP endonucleases: TcAP1, homologous to human APE1 and TcAP2, homologous to *Schizosaccharomyces pombe* Apn2. The expression of these proteins could be fundamental for the parasite survival in the triatomine vector or in the mammalian host.

In order to characterize biochemically and functionally TcAP1 and TcAP2, it is necessary to purify both enzymes under native conditions, using genetic engineering techniques. In this thesis, we inserted TcAP1 and TcAP2 nucleotide coding sequences in different expression vectors designed for eukaryotic cells, which were confirmed by automatic DNA sequencing. With these plasmid constructs, S2 *Drosophila melanogaster* cells, *Pichia pastoris* yeasts cells and *T. cruzi* Dm28c strain epimastigotes were transfected. Surprisingly, it was possible to express both endonucleases only in this last expression model.

The impossibility to express both AP endonucleases in the *P. pastoris* and *D. melanogaster* models could be related with an insufficient or limited variety of some tRNA, needed for the expression of TcAP1 and TcAP2, with the followed decrease in the translation of both genes coding mRNAs. Probably, the tRNAs that present specific anticodons for the translation of the *T. cruzi* AP endonucleases could only be found in adequate concentrations in cells phylogenetically related to the protozoan, which may be used as expression models.

With the purpose of purifying TcAP1-GFP from total homogenates proteins of transfected epimastigotes that expressed this recombinant protein, affinity chromatography was used. However, the recombinant protein purified in native conditions was not obtained. It is concluded that the use of GFP associated as a fusion protein to TcAP1 only allows identification of the recombinant protein, but not its adequate purification.

1 - INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado, agente causal de la enfermedad de Chagas. Presenta un ciclo de vida indirecto con cuatro formas celulares: epimastigote (extracelular y replicativa) que se desarrolla en intestino anterior del vector hematófago; amastigote (intracelular replicativo) y tripomastigote sanguíneo (extracelular no replicativo), presentes en el hospedero mamífero y tripomastigote metacíclico que se encuentra en el tubo digestivo posterior y en las deyecciones del insecto vector.

T. cruzi es capaz de sobrevivir al daño oxidativo del DNA generado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) producidas por su propio metabolismo, así como aquellas producidas en el intestino del insecto vector y en células del hospedero mamífero. En eucariontes, el principal mecanismo de reparación del daño oxidativo al DNA es la vía de escisión de bases (BER), proceso altamente conservado durante la evolución, en el que juegan un rol fundamental las endonucleasas apurínicas/apirimidínicas (endonucleasas AP).

T. cruzi presenta en su genoma secuencias que codificarían para endonucleasas AP, tales como TcAP1, homóloga de APE1 humana y TcAP2, homóloga de APE2 humana y de Apn2 de *Schizosaccharomyces pombe*.

Estas proteínas podrían representar un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento contra la enfermedad de Chagas. La generación de inhibidores específicos, que actúen solo sobre las endonucleasas AP de *T. cruzi*, sin afectar a las endonucleasas AP de *Homo sapiens*, aportarían a incrementar el éxito de las terapias convencionales, fundamentalmente en la fase crónica de la enfermedad.

2 - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 - EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, fue descrita por primera vez por el médico e infectólogo brasileño Carlos Chagas en 1909 (Chagas, 1909). Este investigador es el único en la historia de la medicina que describe con gran detalle el ciclo de transmisión de esta enfermedad (vector, hospedero y agente infeccioso) y las manifestaciones clínicas agudas que se presentan en humanos

infectados (Rassi *et al.*, 2010). El agente causal de esta enfermedad es un protozoo parásito hemoflagelado denominado por Carlos Chagas como *T. cruzi*, en honor a su maestro Oswaldo Cruz (Chagas, 1909).

Esta patología se considera una infección enzoótica y es, según la Organización Mundial de la Salud, una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas en el mundo, afectando principalmente a personas de áreas rurales y periurbanas de Sur y Centroamérica que viven en condiciones sanitarias deficientes. Es por ello que la Tripanosomiasis Americana además de tener un gran impacto para la salud pública, posee un trasfondo social y económico de gran relevancia (Rassi *et al.*, 2010; Prata, 2001). La enfermedad de Chagas es la cuarta causa de muerte en América Latina, generando aproximadamente 43000 muertes por año (Abramson *et al.*, 2005).

La transmisión del parásito es a través de insectos vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae (Teixeira *et al.*, 2008). En Chile, los principales agentes involucrados en la transmisión de *T. cruzi* son *Triatoma infestans*, conocido comúnmente con el nombre de vinchuca, que desarrolla el ciclo de vida domiciliario, y *Mepraia spinolai* que desarrolla el ciclo de vida silvestre del parásito. 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). Por otra parte, 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).

Además de la transmisión vectorial, existen otras formas importantes de transmisión de la enfermedad como la transfusión sanguínea, la vía transplacentaria, el trasplante de órganos, la transmisión oral por alimentos contaminados con el parásito o sus deyecciones, y los accidentes de laboratorio (Prata, 2001; Apt *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010; Toso *et al.*, 2011). Estas formas alternativas de infección han adquirido cada vez mayor importancia epidemiológica (Yoshida, 2008), debido fundamentalmente al proceso de globalización, donde viajeros e inmigrantes infectados se movilizan desde zonas rurales a ciudades y otros países, e introducen la enfermedad a lugares donde no es considerada endémica (Prata, 2001; Schmunis y Yadon, 2009).

T. cruzi se encuentra presente en el continente americano desde hace más de 9000 años, extendiéndose desde el paralelo 43 norte hasta el paralelo 49 sur, abarcando 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 en riesgo de 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 41200 (7.7 por cada 100000 individuos). A su vez, la transmisión por vía transplacentaria aporta con aproximadamente 14385 de casos nuevos anuales (WHO, 2007). Por otro lado, la tasa de mortalidad es muy variable y depende de la fase en que se encuentre el individuo enfermo así como de su condición inmunológica y edad (OIE, 2009).

En Chile, el área endémica de la enfermedad de Chagas se extiende desde la región de Arica-Parinacota hasta la región del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana, presentándose más frecuentemente en áreas rurales y periurbanas. Se calcula que la población expuesta a la enfermedad es de aproximadamente 850000 personas (Apt *et al.*, 2008). Actualmente existen alrededor de 142000 habitantes infectados, concentrados mayoritariamente en la región de Coquimbo, donde se ha registrado la tasa acumulada de mortalidad más alta (20 por 100000 habitantes). La mortalidad en Chile se ha mantenido constante con una tasa de 0.35-0.40 por 100000 habitantes, lo que corresponde a 50-60 muertes al año. Éstas representan el 0.07% de las muertes totales anuales (MINSAL, 2007).

Actualmente, iniciativas multinacionales han permitido el control de la patología a través de muestreo en bancos de sangre para detectar la presencia del parásito. A su vez, gracias a la implementación de programas de control del insecto vector mediante el uso de insecticidas piretroides (Prata, 2001) se consiguió que países como Uruguay lograrán el estatus de libre de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en el año 1997, siguiéndole Chile en 1999, y posteriormente algunas regiones de Brasil en 2006 (Rassi *et al.*, 2010; WHO Expert Committee, 2002). 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 parasitaria en personas jóvenes (Prata, 2001).

2.2 - ETIOLOGÍA

T. cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Los tripanosomátidos pertenecen a una de las ramas divergentes más antiguas en la

evolución de eucariontes, estimándose que existen en la Tierra desde hace 2000 millones de años (Cavalier-Smith, 1993). Se caracterizan por presentar una gran mitocondria que posee entre el 15 al 30% del DNA total del parásito. Además presentan interesantes características biológicas como “trans/splicing nuclear”, edición del RNA del kinetoplasto, síntesis policistronica del RNA y ausencia de condensación de la cromatina durante la división celular (Toro y Galanti, 1988; McCarthy-Burke *et al.*, 1989; Elias *et al.*, 2001; Spadiliero *et al.*, 2002; Lukes *et al.*, 2005).

Exponentes de la familia Trypanosomatidae también se encuentran relacionados a otras patologías como la Enfermedad del sueño o Tripanosomiasis Africana y la Leishmaniasis, que junto a la enfermedad de Chagas son de gran importancia para la medicina humana y animal (De Souza, 2002).

Diversos estudios han determinado la existencia de seis grupos genéticos o linajes en *T. cruzi*, donde TcI y TcIIb serían los más antiguos y TcIIa, TcIIc, TcIIId y TcIIe tendrían su origen en hibridaciones generadas a lo largo de la evolución del parásito (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) y TcVI (antiguo TcIIe) (Zingales *et al.*, 2009). No se ha establecido una correlación definitiva entre la severidad de la enfermedad y el linaje del parásito (Rassi *et al.*, 2010).

2.3 - CICLO DE VIDA DE *T.cruzi*

La transmisión de la enfermedad se inicia con la alimentación del insecto triatomino parasitado, que junto con alimentarse de la sangre del mamífero deposita sus deyecciones, en las cuales se encuentran las formas infectivas no replicativas del parásito, tripomastigotes metacíclicos (Figura 1). Estos penetran al mamífero por el sitio de la picadura, facilitado por enzimas proteolíticas contenidas en la saliva del hematófago y por el rascado de la zona de la picadura (Coura, 2007). En el mamífero, los tripomastigotes metacíclicos pueden invadir diferentes tipos de células, incluyendo macrófagos y fibroblastos. Durante la invasión a la célula hospedera, el tripomastigote es incorporado en una vacuola parasitófora, de la cual escapa al citoplasma, donde se diferencia a la forma replicativa amastigote. Tras un cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes sanguíneos que lisan la célula

del mamífero permitiendo su liberación al torrente sanguíneo, dirigiéndose a órganos blanco como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y células de la glía del sistema nervioso central (Andrade y Andrews, 2005). Posteriormente, cuando un insecto triatomino se alimenta de hospederos mamíferos infectados, ingiere tripomastigotes sanguíneos, los que a nivel del intestino medio del hematófago se diferencian a epimastigotes (forma extracelular y replicativa). Estos últimos, al alcanzar el tracto digestivo posterior del vector, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. El ciclo se cierra cuando el vector triatomino infectado se alimenta nuevamente del mismo u otro hospedero mamífero (Tyler y Engman, 2001).

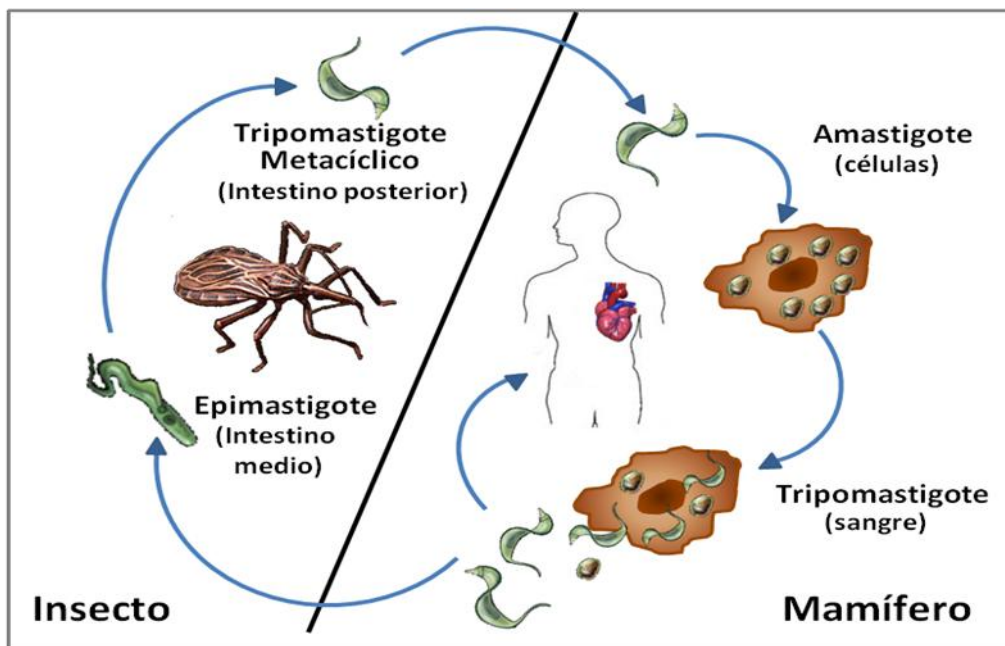


Figura 1.- Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*
(Adaptado de Vazquez, 2007)

2.4 - SIGNOS CLÍNICOS Y MANIFESTACIONES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas puede cursar en tres fases progresivas de presentación: La fase aguda comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito en el individuo, pudiéndose encontrar tripanosomas en la sangre debido a la multiplicación de amastigotes en macrófagos y la posterior liberación de tripomastigotes sanguíneos a la circulación periférica (Andrade y Andrews, 2005). Esta fase tiene una duración de 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 linfonódulos locales. Cuando la entrada ha sido por la conjuntiva ocular, se produce un edema de los párpados unilateral indoloro denominado “Signo de Romaña” (Cevallos y Hernández, 2001; Prata, 2001; OIE, 2009; 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, anorexia, linfadenopatías regionales, hepatoesplenomegalia moderada y miocarditis. Esta sintomatología es más frecuente en niños y sin tratamiento el 5-10% de los pacientes sintomáticos puede morir a causa de encefalomiелitis o falla cardíaca severa (Prata, 2001). El tratamiento con drogas antichagásicas usualmente controla la infección aguda y previene las manifestaciones crónicas (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 corresponde a la fase indeterminada, donde aproximadamente entre el 70 y el 90% de los pacientes nunca llega a presentar síntomas de la enfermedad. El porcentaje restante de los individuos ingresa a la fase crónica de la enfermedad después de 5 a 15 años de producida la infección (OIE, 2009). Usualmente presenta miocarditis asociadas a arritmias, cardiomiopatías dilatadas e hipertrofia de las fibras miocárdicas. En menor proporción los pacientes pueden cursar cuadros de visceromegalias como megaesófago y megacólon, derivadas de daños en el sistema nervioso autónomo (Prata, 2001). 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, cardíacos 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 (OIE, 2009; Rassi *et al.*, 2010).

2.5 - DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas 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 microscópica directa de tripomastigotes en la sangre no-coagulada del paciente. El parásito puede ser también visualizado microscópicamente en un frotis sanguíneo mediante tinción Giemsa. Además en esta fase puede realizarse detección indirecta del organismo mediante xenodiagnóstico, utilizando insectos triatomíneos libres de patógenos (criados en laboratorio) que se alimentan de la sangre del individuo a diagnosticar. Posteriormente se analiza el tracto intestinal del vector en busca de formas parasitarias (Cevallos y Hernández, 2001; Rassi *et al.*, 2010). Por otra parte, en la fase crónica de la enfermedad se utilizan pruebas inmunológicas que detectan anticuerpos específicos contra el parásito en la sangre del paciente, tales como fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, ELISA y aglutinación directa. 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. Además en esta fase puede detectarse el DNA del parásito en la sangre del paciente infectado mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena (Cevallos y Hernández, 2001; Rassi *et al.*, 2010).

2.6 - TRATAMIENTO

Los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterocíclicos: el nitrofurano Nifurtimox (4-[5-nitrofurfurilideno) amino]-3- metiltiomorfolino-1,1-dióxido) y Benznidazol (N-benzil-2- nitroimidazol-1-acetamida), un derivado nitroimidazol, cuya actividad contra *T. cruzi* fue descrita hace casi cuatro décadas (Urbina y Docampo, 2003). Si bien estas drogas actúan contra las diferentes formas del parásito y 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. Por otra parte, ambas drogas pueden presentar toxicidad sistémica y efectos colaterales que incluyen anorexia, malestar gástrico, dolor de cabeza, edema generalizado, disturbios visuales y mentales, neuropatías periféricas, dermatopatía alérgica y depresión de la médula ósea (Rodrigues Coura y De Castro, 2002; Sosa *et al.*, 1998), lo cual muchas veces determina la

suspensión del tratamiento. Estos antecedentes evidencian la necesidad de desarrollar nuevas drogas más eficientes en la eliminación del parásito, así como más inocuas para el hospedero definitivo.

2.7 - ESTRÉS OXIDATIVO Y RESISTENCIA DE *T. cruzi* FRENTE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO

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^-), 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^- no es una molécula muy reactiva, este radical puede reaccionar con NO y producir anión peroxinitrito (NOO⁻), agente generado comúnmente por macrófagos como primera línea de defensa durante la fagocitosis (Hogg *et al.*, 1992). Además, O_2^- 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).

Las cuatro formas celulares de *T. cruzi* se encuentran expuestas a ROS y/o especies reactivas de nitrógeno (RNS). Así, dentro del intestino de los vectores artrópodos, los epimastigotes se enfrentan a moléculas resultantes de la degradación del grupo hemo que en presencia de H_2O_2 generan radicales OH^\cdot (Graça-Souza *et al.*, 2006). Por otra parte, en el inicio de la infección parasitaria, los tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos enfrentan la primera línea de defensa del sistema inmune innato de mamíferos, los macrófagos. Los tripomastigotes ingresan a los macrófagos mediante la formación de una vacuola parasitófora, en la cual se encuentran expuestos a la producción de ROS (Hogg *et al.*, 1992) y RNS (Cummings y Tarleton., 2004). Sin embargo, estos mecanismos de defensa no eliminan completamente al parásito, estableciéndose una infección crónica en el hospedero vertebrado. Finalmente, estudios recientes indican que cardiomiocitos infectados crónicamente con la forma amastigote de *T. cruzi*, presentan un estado de estrés oxidativo permanente (Zacks *et al.*, 2005).

A pesar de que todas las macromoléculas celulares están sujetas a daño por ROS/RNS, las consecuencias deletéreas primarias del estrés oxidativo probablemente se relacionen con el daño al DNA (Riley, 1994). Células procariontes y eucariontes se encuentran constantemente expuestas a agentes oxidantes endógenos y exógenos que inducen daño en el DNA generando lesiones de bases, 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 que conducen a la reparación del daño oxidativo en el DNA en *T. cruzi* son desconocidos.

2.8 - VÍA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (BER) Y ENDONUCLEASAS APURÍNICAS/APIRIMIDÍNICAS (ENDONUCLEASAS AP)

La vía BER es un mecanismo altamente conservado durante la evolución, involucrado principalmente en la reparación de daño oxidativo que se produce en las bases del DNA.

En mamíferos, se han descrito dos sub-vías de BER: la vía corta, que repara sólo el nucleótido dañado y la vía larga, que repara el nucleótido dañado más fragmentos de uno o más nucleótidos sin daño (Kumar *et al.*, 2011). Ambas sub-vías comparten un inicio enzimático, donde una DNA glicosilasa específica detecta la base dañada y la elimina realizando un corte enzimático en el enlace N-glicosídico existente entre la base y la pentosa. Como resultado se genera un sitioapurínico/apirimidínico o sitio abásico (sitio AP). El residuo azúcar/fosforilo remanente es reconocido por una endonucleasas AP que corta el enlace 5' fosfodiéster del sitio AP, generando un extremo 3' OH libre. Este sirve como sustrato para una DNA polimerasa que incorpora el nucleótido correspondiente mediante complementariedad de bases (Robertson *et al.*, 2009).

Diversos estudios indican que en la vía corta de BER participa principalmente la DNA polimerasa β que, además de tener actividad polimerasa, presenta actividad AP

liasa o deoxiribosafosfodiesterasa que permite la eliminación del remanente de azúcar/fosfato mediante un corte en el enlace 3' fosfodiester, proceso denominado β -eliminación. Además de la DNA β -polimerasa, algunas DNA glicosilasas bifuncionales poseen actividad AP liasa (Ide y Kotera, 2004; Robertson *et al.*, 2009). Una vez que se ha agregado el nucleótido faltante, una DNA ligasa se encarga de unir los extremos 3' - 5' de la hebra de DNA (Kumar *et al.*, 2011).

La vía larga BER, a diferencia de la corta, hace uso de las DNA polimerasas β , δ o ϵ que se unen al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y agregan más de un nucleótido en la reparación. Paralelamente se genera un remanente de nucleótidos a medida que la DNA polimerasa agrega nuevos nucleótidos. Esta cadena es reconocida por una Flap endonucleasa 1 (FEN1), que realiza la β -eliminación, permitiendo así que una DNA ligasa termine la reparación del DNA (Robertson *et al.*, 2009).

En mamíferos, más del 95% de la actividad de procesamiento de sitios AP es realizada por la endonucleasas AP APE1 (HAP1, APEX o Ref1) (Marenstein *et al.*, 2004). APE1 es fundamental para la mantención del genoma y la supervivencia celular. La supresión de la expresión de APE1 mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi) genera detención del ciclo celular e inducción de apoptosis en diferentes tipos celulares (Dempsey y Sung, 2005). De manera similar, ratones *knock-out* para APE1 no se desarrollan más allá de la etapa de blastocisto (Ludwig *et al.*, 1998). En contraste a células de mamíferos, cepas de *E. coli* carentes de ExoIII (la principal endonucleasa AP de bacterias) son viables pero sensibles a agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno, luz UV y rayos X (Souza *et al.*, 2006).

Estudios recientes realizados por Cabrera *et al.* (2011) indican que la inhibición de la vía BER, utilizando metoxiamina, se relaciona a una disminución de la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* sometidos a estrés oxidativo. Debido a que metoxiamina impide el reconocimiento de los sitios AP por las endonucleasas AP, estos resultados sugieren que en ambas formas celulares debería expresarse alguna endonucleasa de este tipo. En *T. cruzi* se ha descrito la secuencia del gen codificante para APE1 parasitario (TcAP1) y se ha demostrado que la complementación de cepas de *E. coli* carentes de ExoIII con el gen que codifica para la proteína TcAP1, les confiere resistencia frente a agentes oxidantes y alquilantes (Pérez *et al.*, 1999). Además, trabajos realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, demostraron que TcAP1 se expresa en epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.

En mamíferos, también se ha descrito la existencia de una segunda endonucleasa AP, APE2. Esta enzima presenta una baja actividad endonucleasa, pero alta actividad 3' fosfodiesterasa y exonucleasa 3'-5' (Burkovics *et al.*, 2006). Sin embargo, en otros eucariontes como *Arabidopsis thaliana* y *S. pombe* se ha demostrado que homólogos de APE2 pueden tener un rol fundamental en la reparación del daño oxidativo del DNA y la supervivencia celular, llegando a ser incluso más importantes que homólogos de APE1 (Ribar *et al.*, 2004; Tanihigashi *et al.*, 2006).

La secuencia del gen que codifica para APE2 también se encuentra en *T. cruzi* (TcAP2, Genbank access 71654547), sin embargo hasta ahora no se han realizado estudios sobre su probable expresión y/o función.

Es de importancia destacar que gracias a estudios realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, se logró caracterizar y comparar la secuencia aminoacídica de TcAP1 y TcAP2 con la principal endonucleasa AP de *H. sapiens* (APE1; GenBank access AAH08145) (Figura 2). Los resultados obtenidos indican que entre las proteínas TcAP1 y APE1 existe un porcentaje de identidad de un 35%, mientras que entre TcAP2 y APE1 existe un porcentaje de identidad de un 31%. Si bien existen diferencias evidentes entre las secuencias aminoacídicas de estas tres endonucleasas AP, los residuos aminoacídicos que conforman la región catalítica son conservados entre las tres. Las divergencias observadas para proteínas de la misma actividad enzimática entre *H. sapiens* y *T. cruzi* son las esperadas acorde a su ubicación en la escala evolutiva (Galanti *et al.*, 1998). Además, mediante modelación computacional por homología en 3 dimensiones de las proteínas TcAP1 y TcAP2, basado en la cristalografía de APE1 de *H. sapiens* (Figura 3), se pudo evidenciar las similitudes existentes entre las estructuras terciarias de las endonucleasas AP de *T. cruzi* y APE1 de *H. sapiens*. Éstas, sumadas a la homología existente entre los aminoácidos que conforman el sitio catalítico de estas tres endonucleasas AP, sugieren que tanto TcAP1 como TcAP2 presentan actividad endonucleasa AP y participan en la reparación del DNA. Sin embargo, las importantes diferencias que se observan en la localización espacial y la distancia de los residuos que conforman el sitio catalítico de las 3 enzimas, son indicadores de divergencias que sugieren la posibilidad de diseño de posibles inhibidores específicos de TcAP1 y TcAP2, que no afecten la actividad de APE1 de *H. sapiens*, de la misma forma como ha sido descrito entre Exo III de *E. coli* y APE1 humana (Zawahir *et al.*, 2009).

Por lo anteriormente mencionado, es fundamental dilucidar la posible participación de ambas endonucleasas AP de *T. cruzi* en la reparación del DNA del parásito mediante la evaluación de la actividad enzimática *in vitro* de TcAP1 y TcAP2 recombinantes. Hasta el momento no ha sido posible generar ambas proteínas recombinantes en condiciones nativas, así como tampoco se ha logrado establecer un sistema de expresión que permita obtener adecuadas concentraciones de estas proteínas para posteriores ensayos *in vitro*.

2.9 - EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La mayor proporción de las proteínas de una célula eucarionte se expresa en cantidades muy reducidas. Una de las contribuciones más trascendentales aportadas por la tecnología del DNA recombinante a la biología celular, es la producción de grandes cantidades de una proteína específica en una célula en particular. Se considera una proteína recombinante aquella proteína cuya síntesis se origina en un organismo diferente al organismo que originalmente expresa la proteína nativa.

Para producir grandes cantidades de la proteína recombinante de interés en células vivas, se utilizan vectores de expresión. Generalmente estos vectores son plasmidios diseñados para producir una gran cantidad de mRNA estable, que puede traducirse a proteína de forma eficiente en la célula transformada o transfectada, ya sea una bacteria, una levadura o una célula de insecto o mamífero.

La proteína de interés se produce en el interior de la célula, por lo que deberá ser purificada del resto de las proteínas de la célula hospedera. De esta forma, muchos vectores de expresión han sido diseñados para incorporar una etiqueta molecular a la proteína expresada, como por ejemplo una zona rica en histidinas o una pequeña proteína marcadora, que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad. En la actualidad, se dispone de numerosos vectores de expresión, cada uno de ellos diseñados para que actúe en el tipo celular en el que se desee producir la proteína (Alberts *et al.*, 2010).

Con el fin de utilizar proteínas recombinantes en estudios funcionales estas deben cumplir con ciertas características estructurales específicas, entre las cuales se pueden encontrar el número de enlaces disulfuro, cortes proteolíticos, glicosilaciones, sialización y modificaciones aminoacídicas (fosforilación, acetilación, imidación, sulfuración, isoprenilación, adición de ácidos grasos). Además, un correcto plegamiento

de la proteína es fundamental al momento de cumplir su función, plegamiento que está regulado por dos grupos de enzimas, las plegasas y las chaperonas.

Los distintos cambios post-traduccionales a los que muchas proteínas deben someterse son un punto fundamental al momento de elegir una célula hospedera que posea un ambiente bioquímico adecuado para llevarlos a cabo, y de esta manera asegurar la obtención de un producto activo, soluble y que además se encuentre en el compartimiento subcelular al que estaba destinado (Burgess, 2009; Brondyk, 2009; Greene, 2004).

En la actualidad se cuenta con distintos sistemas de expresión de células eucariontes que permiten la generación de proteínas recombinantes, entre los cuales se encuentran los modelos de *P. pastoris*, *D. melanogaster* y *T. cruzi*, que asocian diversos marcadores moleculares a proteínas que se desean expresar (Cregg *et al*, 2000; Green, 2004; Lorenzi *et al*, 2003). En esta Memoria se propone que el uso de dichos modelos permitirá la expresión y purificación en condiciones nativas de las endonucleasas AP TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.

3 - HIPÓTESIS

La clonación de genes que codifican para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi* en vectores de expresión para *P. pastoris*, *D. melanogaster* y *T. cruzi* permitirá expresar y purificar ambas proteínas recombinantes en condiciones nativas.

4 - OBJETIVO GENERAL

Generar y purificar las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.

5 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Insertar las secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi* en vectores de clonamiento y expresión de *P. pastoris*, *D. melanogaster* y *T. cruzi*.
2. Expresar las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi* en los modelos de expresión de *P. pastoris*, *D. melanogaster* y *T. cruzi*.
3. Determinar la localización subcelular de TcAP1 y TcAP2 recombinantes en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados.
4. Purificar en condiciones nativas las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi* en los modelos celulares de expresión de *P. pastoris*, *D. melanogaster* y *T. cruzi*.

6 - MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 - Obtención de secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.

6.1a - Cultivo de epimastigotes y obtención de DNA genómico.

El cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) se realizó en medio Diamond suplementado con 10% de suero fetal bovino, hemina 75 μ M y antibióticos (penicilina 75 U/ml y estreptomicina 75 μ g/ml), mantenidos a 28°C.

La extracción del DNA genómico de epimastigotes se realizó utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. El DNA se cuantificó mediante fluorometría utilizando Quant-iT™ dsDNA HS Assay (Invitrogen).

6.1b - Amplificación de secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.

Debido a resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio que señalan que la expresión de la proteína recombinante TcAP1 es altamente tóxica en bacterias, y que TcAP2 expresada en bacterias forma cuerpos de inclusión insolubles, se procedió a obtener las proteínas recombinantes en modelos eucariontes. Para ello se utilizaron vectores de expresión para levaduras *P. pastoris* (pPICZ) y células S2 de *D. melanogaster* (pMT/V5) que generan una proteína de fusión con 6 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína. A su vez se utilizó un vector de expresión para epimastigotes de *T. cruzi* (pTREX) que genera una proteína de fusión con la proteína fluorescente verde GFP.

Para la obtención de amplificadores de secuencias de DNA codificantes para las endonucleasas TcAP1 (1218 pb) y TcAP2 (1839 pb) de *T. cruzi* se empleó la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) utilizando DNA genómico de *T. cruzi* como DNA molde. Los partidores específicos para ambos genes fueron diseñados para insertarlos de manera dirigida en los diferentes vectores de expresión. Para tales efectos, a cada partidor se agregó fragmentos nucleotídicos en los extremos del producto amplificado correspondientes a sitios de corte para enzimas de restricción específicas. Para insertar los genes codificantes de TcAP1 y TcAP2 en el vector de expresión pPICZ se diseñaron oligonucleótidos partidores sentido y antisentido con sitios de corte para la

enzima *XbaI* (en rojo). Para el uso del vector de expresión pMT/V5 se diseñaron oligonucleótidos partidores sentido con un sitio de corte para *SpeI* (en rojo) para TcAP1 y con un sitio de corte para *KpnI* (en rojo) para TcAP2, así como oligonucleótidos partidores antisentido con un sitio de corte para *AgeI* (en azul) para ambos genes. Finalmente, para insertar ambos genes en el vector de expresión pTREX se diseñaron oligonucleótidos partidores sentido con un sitio de corte para *XbaI* (en rojo) y oligonucleótidos partidores antisentido con un sitio de corte para *HindIII* (en azul).

Las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos partidores, para cada endonucleasa y para cada vector de expresión, son los que se muestran a continuación. En verde se destacan las secuencias Kozak presentes en los oligonucleótidos partidores sentido diseñados para *P. pastoris* y *D. melanogaster*.

Oligonucleótidos partidores utilizados para amplificar TcAP1:

Modelo de levaduras *P. pastoris*.

- Sentido pPICZ: AGTCTAGAGCAATGGGAATGCCGTCGGGACCTAAGG
- Antisentido pPICZ: GCTCTAGACCCCTGCGCAGCCACATCTGC

Modelo de células S2 de *D. melanogaster*.

- Sentido pMT/V5: GACTAGTGCAATGGGAATGCCGTCGGGACCTAAGG
- Antisentido pMT/V5: CACACCGGTCTGCGCAGCCACATCTGC

Modelo de epimastigotes de *T. cruzi*.

- Sentido pTREX: GCTCTAGAAATGCCGTCGGGACCTAAGG
- Antisentido pTREX: CCCAAGCTTCCTGCGCAGCCACATCTGC

Oligonucleótidos partidores utilizados para amplificar TcAP2:

Modelo de levaduras *P. pastoris*.

- Sentido pPICZ: AGTCTAGAGCAATGGGAATGTTTATCATTAGTTGGAATGTG
- Antisentido pPICZ: GCTCTAGACCGGAAATAACATCGGTAATTTCAAT

Modelo de células S2 de *D. melanogaster*.

- Sentido pMT/V5: GGGGTACCGCAATGGGAATGTTTATCATTAGTTGGAATGTG
- Antisentido pMT/V5: CACACCGGTGGAAATAACATCGGTAATTTCAAT

Modelo de epimastigotes de *T. cruzi*.

- Sentido pTREX: GCTCTAGAAATGTTTATCATTAGTTGGAATGTG
- Antisentido pTREX: CCCAAGCTTGGAAATAACATCGGTAATTTCAAT

El protocolo de PCR fue el siguiente:

Se utilizaron 25 μ l totales de reacción, agregando 180 ng de DNA molde, 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 U de DNA Taq polimerasa Platinum[®] (Invitrogen) y 16 pmol de cada oligonucleótido partidor. Los ciclos termales fueron: 5 minutos de denaturación a 95°C, seguidos de 20 ciclos de 0.5 minutos a 95°C, 0.5 minutos a 60°C y 1.5 (para TcAP1) o 2 minutos (para TcAP2) a 72°C. Posteriormente se aplicaron 20 ciclos de 0.5 minutos a 95°C y 1.5 (para TcAP1) o 2 minutos (para TcAP2) a 72°C. La extensión final fue de 5 minutos a 72°C. El tamaño esperado de la región amplificada corresponde aproximadamente a 1218 pares de bases para TcAP1 y aproximadamente a 1839 pares de bases para TcAP2.

La visualización de los fragmentos génicos amplificados se realizó en geles de agarosa 1% p/v, en buffer TBE pH 8.0, teñidos con bromuro de etidio.

6.1c - Purificación de los fragmentos amplificados desde los geles de agarosa.

Las secuencias amplificadas de TcAP1 y TcAP2 fueron purificadas a partir de geles de agarosa 1% p/v, en buffer TBE pH 8.0, utilizando el kit SV Gel and PCR Clean-Up System[®] (Promega) según las instrucciones del fabricante.

6.2 – Inserción de las secuencias de DNA codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi* en vectores de expresión pPICZ, pMT/V5 y pTREX y purificación de los constructos.

Los productos amplificados y purificados de las secuencias que codifican para TcAP1 y TcAP2 así como los vectores de expresión pPICZ, pMT/V5 y pTREX fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción, específicas para cada modelo de expresión como se detalla en 6.1b. Para ello, se agregó a 1 μ g de DNA del vector de expresión o del amplificado y 1 μ l de cada una de las enzimas de restricción (10 U/ μ l) en buffer de reacción. Los reactantes se incubaron durante 5 horas a 37°C. Luego, las enzimas se inactivaron incubando la reacción a 85°C durante 20 minutos.

Para el ligamiento de los fragmentos amplificados de las secuencias codificantes para TcAP1 y TcAP2 en los vectores de expresión se utilizó DNA ligasa T₄ (Promega) (0.3 U/ μ l) en presencia de 1 mM ATP, durante toda la noche a 4°C.

Con los constructos obtenidos (pPICZ-*TcAP1*, pPICZ-*TcAP2*, pMT/V5-*TcAP1*, pMT/V5-*TcAP2*, pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP*) se transformaron por

electroporación bacterias *E. coli* BL21 electrocompetentes. Para detectar la presencia de los insertos en las colonias previamente seleccionadas con ampicilina, se aplicó la técnica de PCR de colonia utilizando los partidores correspondientes a cada una de las secuencias. La visualización de los fragmentos amplificados de cada clon se realizó en geles de agarosa 1% p/v en buffer TBE pH 8.0 teñidos con bromuro de etidio. Finalmente se purificó el DNA plasmidial de las colonias positivas a la técnica de PCR de colonia, utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), según instrucciones del fabricante. Los plasmidios obtenidos se analizaron mediante secuenciación automática de DNA.

6.3 – Incorporación de los constructos en células eucariontes.

6.3a - Transfección estable de los constructos pPICZ-*TcAPI* y pPICZ-*TcAP2* en levaduras *P. pastoris* y pMT/V5-*TcAPI* y pMT/V5-*TcAP2* en células S2.

La transfección de levaduras *P. pastoris* con los constructos pPICZ-*TcAPI* y pPICZ-*TcAP2*, previamente linealizados con la enzima de restricción *Xba*I, se realizó mezclando 80 µl de levaduras electrocompetentes con 10 µg de DNA de cada constructo de manera separada en cubetas de electroporación de 0.2 cm de distancia entre los electrodos, aplicando un pulso de 1500V. Luego se agregó 1 ml de sorbitol frío y se transfirió a un tubo estéril de 15 ml e incubó a 30°C durante 2 horas.

Posteriormente se aplicó 10, 25, 50, 100 y 200 µl de las levaduras transfectadas a placas YPDS (medio de extracto de levadura con peptona y dextrosa) agar suplementadas con 100 µg/ml de bleomicina. Las placas se incubaron a 30°C por 10 días hasta observar la formación de colonias.

Por otra parte, la transfección de las células S2 de *D. melanogaster* se logró mediante electroporación, agregando 50 µg de DNA de los constructos pMT/V5-*TcAPI* y pMT/V5-*TcAP2* y 2 µg de plasmidio pCohigro a 1×10^7 células S2, previamente centrifugadas y resuspendidas en 300 µl de medio Schneider's sin suplementar. La electroporación fue realizada a 110V y 950 µF en cubetas de 0.2 cm de distancia entre los electrodos. Como control, se transfectaron por electroporación células S2 sólo con el plasmidio pCohigro. Posteriormente las células se resuspendieron en 6 ml de medio Schneider's suplementado con 10% de SFB. Finalmente, luego de 48 horas se agregaron 300 µg/ml de higromicina y se incubaron durante 10 días.

6.3b – Transfección de epimastigotes con los constructos pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP*.

Para la transfección de epimastigotes de *T. cruzi* con los constructos pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP* se resuspendieron 4×10^7 epimastigotes en fase exponencial de crecimiento en 300 μ l de buffer de electroporación (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ a pH 7.6). Posteriormente se agregó 90 ng de cada uno de los plasmidios independientemente y se transfirió por electroporación a 350V y 500 μ F. Los parásitos fueron resuspendidos y mantenidos en medio Diamond con 20% FBS. Luego de 24 horas se agregó el antibiótico G418 (neomicina) en una concentración de 250 μ g/ml para seleccionar los parásitos que adquirieron el plasmidio. Después de 48 horas la concentración de G418 se aumentó a 500 μ g/ml. En un período aproximado de 3 a 4 semanas se observó la presencia de parásitos expresando constitutivamente las proteínas de fusión asociadas a GFP, mediante microscopía de fluorescencia.

6.4 – Inducción de la expresión de las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.

6.4a – Inducción en levaduras *P. pastoris*.

25 ml de células *P. pastoris* transfectadas con el constructo pPICZ-*TcAP1* en medio BMGY (medio tamponado con glicerol) en fase exponencial de crecimiento (OD₆₀₀ de 2-6) fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 ml de MMH (medio con mínima concentración de metanol, con histidina). La incubación se realizó a 28°C con agitación (250 rpm). Cada 24 horas se agregó 0.5% ó 1% metanol al cultivo. Las levaduras fueron cosechadas cada 24 horas.

6.4b – Inducción en células S2 de insecto.

Células S2 transfectadas en fase exponencial de crecimiento ($2-4 \times 10^6$ /ml), previamente seleccionadas con higromicina, fueron inducidas a expresar las proteínas de interés utilizando 1 mM de CuSO₄ a las 24, 48 y 72 horas. La toma de muestras se realizó tomando 1 ml del cultivo celular en los tiempos mencionados.

6.5 – Comprobación de la expresión de las endonucleasas recombinantes TcAP1 y TcAP2 en modelos de expresión de levaduras *P. pastoris*, células S2 de *D. melanogaster* y epimastigotes de *T. cruzi*.

Se realizaron ensayos de *Western blot* para confirmar la expresión de las proteínas recombinantes en los 3 modelos celulares. Para tales efectos se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%, 60 µg de homogeneizados de proteínas totales provenientes de levaduras, células de S2 o epimastigotes transfectados. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membranas fueron bloqueadas con BSA 5% p/v en PBS durante 2 horas a 37°C y lavadas 3 veces con PBS-Tween 0.05% v/v.

Para los homogeneizados de *P. pastoris* y células S2 la identificación se realizó incubando las membranas con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-histidina (Clontech) en una dilución 1:5000 v/v en PBS-Tween 0.05% v/v por 2 horas a temperatura ambiente.

En el caso de los homogeneizados de epimastigotes la incubación se realizó utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GFP (Thermo Scientific) en una dilución 1:6000 v/v en PBS-Tween 0.05% v/v o un anticuerpo primario monoclonal anti TcAP1 o TcAP2 en una dilución 1:4000 v/v en PBS-Tween 0.05% v/v por 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, todas las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución 1:10000 v/v en PBS-Tween 0.05% v/v por 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, el revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific).

Además, para el modelo de epimastigotes de *T. cruzi* la expresión de las endonucleasas recombinantes fue confirmada, en primera instancia, por microscopia de fluorescencia a una longitud de onda de 450-490 nm.

6.6 – Localización subcelular de las endonucleasas recombinantes TcAP1-GFP y TcAP2-GFP expresadas en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados.

La localización subcelular de TcAP1-GFP y TcAP2-GFP se realizó mediante inmunodetección de GFP sobre extendidos de parásitos transfectados, fijados con metanol 70% frío durante 30 minutos. Para tales efectos, las muestras fueron bloqueadas con solución de bloqueo (BSA 1% p/v, saponina 0.1 % v/v, suero de ternero

3% v/v en PBS) durante 2 horas a 37°C e incubadas con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GFP (Thermo Scientific) en una dilución 1:100 v/v en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los extendidos fueron incubados con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) en una dilución 1:300 v/v en solución de bloqueo. Finalmente, las muestras fueron sometidas a contratinción nuclear con DAPI, montadas y visualizadas con un microscopio de fluorescencia. Las fotografías fueron obtenidas con filtro 430±20 nm para evidenciar fluorescencia azul (DAPI) y con filtro 520±20 nm, que permite la identificación de fluorescencia verde (Alexa fluor 488). Las fotografías fueron procesadas computacionalmente para determinar la sobreposición de DAPI (utilizando pseudocolor rojo) con Alexa fluor 488 (verde).

6.7 - Purificación en condiciones nativas de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP.

Debido al bajo nivel de expresión obtenido para TcAP2 en el modelo de células S2 y la nula expresión de TcAP1, tanto para el modelo de células S2 y de levaduras *P. pastoris*, se procedió a purificar mediante inmunoprecipitación TcAP1-GFP en condiciones nativas a partir de epimastigotes de *T. cruzi* transfectados, utilizando un anticuerpo de conejo policlonal anti GFP y el kit Crosslink Immunoprecipitation (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.7a - Obtención de homogenizados de proteínas totales a partir de epimastigotes expresando TcAP1-GFP.

Se centrifugaron cultivos en fase exponencial de epimastigotes transfectados que evidenciaban una alta expresión de TcAP1-GFP a la microscopia de fluorescencia. El sedimento obtenido fue resuspendido e incubado durante dos horas a 4°C en agitación en buffer de lisis del kit Crosslink Immunoprecipitation (Thermo Scientific).

6.7b – Inmunoprecipitación de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP.

La purificación de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP se realizó mediante cromatografía de afinidad, preparando columnas de agarosa unida a proteína G del kit comercial Crosslink Immunoprecipitation (Thermo Scientific) unida covalentemente a un anticuerpo ratón anti-GFP policlonal, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las columnas fueron cargadas con homogeneizados de proteínas totales obtenidas en el

punto 6.6a e incubadas por 2 horas a 4°C en agitación, asegurando una mezcla homogénea entre la columna y las proteínas. Después de sucesivos lavados de la columna se realizó la elución de la proteína usando un buffer de elución (pH 2.8, con aminos primarias). De esta forma, se obtuvieron 3 eluciones seriadas las que fueron neutralizadas con 1 M Tris pH 9.5 al momento de ser obtenidas.

6.7c – Comprobación de la purificación de TcAP1-GFP.

La presencia de la endonucleasa recombinante TcAP1-GFP, en los eluatos obtenidos en el punto 6.7b, fue confirmada mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GFP (Thermo Scientific) en una dilución 1:6000 v/v en PBS-Tween 0.05% v/v por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución 1:10000 v/v en PBS-Tween 0.05% v/v por 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). No se realizó la purificación de TcAP2-GFP (ver 7.5).

7- RESULTADOS

Se amplificaron las secuencias nucleotídicas de TcAP1 y TcAP2 a partir de DNA genómico de *T. cruzi*, utilizando los oligonucleótidos partidores diseñados específicamente para insertarlas en los vectores de expresión mencionados. En la figura 4 se muestran geles de agarosa 1% p/v en TBE 1x pH 8.0, teñidos con bromuro de etidio, de los amplificadores por PCR de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 (A) y TcAP2 (B).

7.1- EXPRESIÓN DE TcAP1 Y TcAP2 RECOMBINANTES EN LEVADURAS *P. pastoris*.

Se ligaron las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 en el vector de expresión pPICZ. Con el producto ligado se transformó bacterias *E. coli* cepa BL21 por electroporación. Se realizó un PCR de colonias para comprobar la presencia de los constructos pPICZ-*TcAP1* y pPICZ-*TcAP2* en las colonias de bacterias obtenidas. En las figuras 5 y 6 se observan los fragmentos de DNA de TcAP1 y TcAP2 amplificadas desde diversas colonias, separados en geles de agarosa 1% p/v en TBE 1x pH 8.0, teñidos con bromuro de etidio. Se obtuvo 1 colonia positiva para pPICZ-*TcAP1* y 8 colonias positivas para pPICZ-*TcAP2*. Se seleccionó una colonia de cada transformación y a partir de ellas se purificaron los constructos, siguiendo el protocolo descrito en 6.2. La correcta inserción de las secuencias nucleotídicas de TcAP1 y TcAP2 en el vector pPICZ se corroboró aplicando la técnica de PCR, utilizando ambos constructos purificados como DNA molde (figura 7) y mediante secuenciación automática de DNA (Figuras 8 y 9).

Los constructos pPICZ-*TcAP1* y pPICZ-*TcAP2*, previamente linealizados, fueron transfectados en levaduras *P. pastoris*. Para determinar la inserción del constructo pPICZ-*TcAP1* en el genoma de las levaduras, se realizó un PCR de colonias de levaduras. En la figura 10 se observa los fragmentos de DNA de TcAP1 amplificadas desde cinco colonias de levaduras (carriles 6, 7, 11, 12 y 13), separados en geles de agarosa 1% p/v en TBE 1x pH 8.0, teñidos con bromuro de etidio. No fue posible obtener colonias transfectadas con pPICZ-*TcAP2*.

La inducción de la expresión de la proteína recombinante TcAP1 en *P. pastoris* se realizó incubando una de las colonias positivas al PCR (carril 6, figura 10) con

metanol 0.5% y 1% durante 24, 48 y 72 horas. Para detectar la expresión de TcAP1 recombinante, se obtuvieron homogeneizados de proteínas totales provenientes de alícuotas del cultivo de levaduras antes y después de la inducción y se analizaron mediante ensayos de *Western blot*. Esto último se llevó a cabo utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti histidina y un anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano. El revelado se hizo por quimioluminiscencia. Aplicando esta metodología, no se detectó la presencia de una banda concordante con el tamaño esperado para TcAP1 (no mostrado).

7.2- EXPRESIÓN DE TcAP1 Y TcAP2 RECOMBINANTES EN CÉLULAS S2 DE *D. melanogaster*.

Una vez obtenidas las ligaciones de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 en el vector pMT/V5 se procedió a transformar por electroporación bacterias *E. coli* cepa BL21. Se realizó un PCR de colonias para comprobar la presencia de los constructos pMT/V5-*TcAP1* y pMT/V5-*TcAP2* en las colonias de bacterias obtenidas. En las figuras 11 y 12 se observan los fragmentos de DNA de TcAP1 y TcAP2 amplificados desde diversas colonias, separados en geles de agarosa 1% p/v en TBE 1x pH 8.0, teñidos con bromuro de etidio. Se obtuvo 6 colonias positivas para pMT/V5-*TcAP1* y 2 colonias positivas para pMT/V5-*TcAP2*. Se seleccionó una colonia de cada transformación y a partir de ellas se purificaron los constructos, siguiendo el protocolo descrito en 6.2. La correcta inserción de las secuencias nucleotídicas de TcAP1 y TcAP2 en el vector pMT/V5 se corroboró aplicando la técnica de PCR, utilizando ambos constructos purificados como DNA molde (figura 13), y mediante secuenciación automática de DNA (Figuras 14 y 15).

Los constructos pMT/V5-*TcAP1* y pMT/V5-*TcAP2* purificados fueron transfectados, junto al plasmidio pCOHIGRO, en células S2 de *D. melanogaster*. La selección de las células transfectadas se realizó incubando con higromicina durante 10 días. Posteriormente se procedió a inducir la expresión de TcAP1 y TcAP2 recombinantes utilizando CuSO₄ a las 24, 48 y 72 horas. Para detectar la expresión de TcAP1 y TcAP2 recombinantes, se obtuvieron homogeneizados de proteínas totales provenientes de alícuotas del cultivo celular antes y después de la inducción y se analizaron mediante ensayos de *Western blot*. Esto último se llevó a cabo utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti histidina y un anticuerpo secundario anti ratón

conjugado con peroxidasa de rábano. El revelado se hizo por quimioluminiscencia (figura 16).

El anticuerpo utilizado no fue capaz de reconocer bandas en homogeneizados de proteínas totales de células S2 transfectadas con el constructo pMT/V5-*TcAP1* (figura 16A) Por el contrario, el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 69 kDa correspondiente a TcAP2 recombinante, luego de la inducción con CuSO₄ a las 24, 48 y 72 horas de células S2 tranfectadas con el constructo pMT/V5-*TcAP2* (figura 16B).

7.3- EXPRESIÓN DE TcAP1-GFP Y TcAP2-GFP EN EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi*.

Una vez obtenidas las ligaciones de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 en el vector pTREX se procedió a transformar mediante electroporación bacterias *E. coli* cepa BL21. Se realizó un PCR de colonias para comprobar la presencia de los constructos pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP* en las colonias de bacterias transformadas (no mostrado). Desde colonias positivas a la técnica de PCR se purificaron ambos constructos siguiendo el protocolo descrito en 6.2. La correcta inserción de las secuencias nucleotídicas de TcAP1 y TcAP2 en el vector pTREX se corroboró aplicando la técnica de PCR, utilizando ambos constructos purificados como DNA molde (figura 17), y mediante secuenciación automática de DNA (Figuras 18 y 19).

Los constructos pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP* purificados fueron transfectados por electroporación en epimastigotes de *T. cruzi*. La selección de las células transfectadas se realizó incubando los parásitos con el antibiótico G-418 (neomicina) durante 3 a 4 semanas. Para detectar la expresión de TcAP1-GFP y TcAP2-GFP recombinantes en epimastigotes transfectados, se observó, mediante microscopía de fluorescencia, la presencia de parásitos expresando la proteína GFP fusionada a las endonucleasas AP TcAP1 y TcAP2 recombinantes de *T. cruzi* (Figura 20). Además se obtuvieron homogeneizados de proteínas totales provenientes de alícuotas de cultivos parasitarios transfectados, los que fueron analizados mediante ensayos de *Western blot* utilizando alternativamente un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP (figura 21 A1 y B1) y un anticuerpo policlonal de conejo anti TcAP1 (figura 21 A2) o anti TcAP2 (figura 21 B2). Luego de varios lavados se incubó con un anticuerpo secundario anti ratón o anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano. El revelado se hizo por

quimioluminiscencia. En la figura 21 A1 se observa que TcAP1-GFP presenta una masa molecular mayor a la esperada (aproximadamente 73kDa). Sin embargo, la misma banda se identifica con el anticuerpo anti-TcAP1 (figura 21 A2), confirmando que se trata de la proteína de fusión esperada. De manera similar a lo observado para TcAP1-GFP, la proteína de fusión TcAP2-GFP presenta una masa molecular mayor a la esperada (aproximadamente 90 kDa) (figura 21 B1). Al igual que en caso anterior, esta misma banda se identifica con el anticuerpo anti-TcAP2 (figura 21 B2), confirmando la identidad de la proteína. Para TcAP2 se empleó un plasmidio con una secuencia de 78 nucleótidos entre TcAP2 y GFP que genera un péptido con estructura de α -hélice que separa ambas proteínas (TcAP2 y GFP). Este plasmidio genera una proteína GFP de masa molecular cercana a 30 kDa (figura 21 B1), mientras que el plasmidio utilizado para TcAP1 genera una proteína GFP de aproximadamente 27 kDa (figura 21 A1). Los anticuerpos anti-TcAP1 y anti-TcAP2 se obtuvieron en el laboratorio contra secuencias de péptidos específicos de estas proteínas.

Se concluye que los parásitos transfectados efectivamente están expresando las proteínas recombinantes.

7.4- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TcAP1-GFP Y TcAP2-GFP EN EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi*.

A diferencia de los epimastigotes transfectados con el vector pTREX-GFP, la emisión de fluorescencia de los parásitos transfectados con pTREX-GFP-TcAP1 o pTREX-GFP-TcAP2 se encuentra delimitada a un área específica de los parásitos (figura 20). Para determinar la localización subcelular de TcAP1-GFP y TcAP2-GFP se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP. La comparación de la localización de GFP con las zonas ricas en DNA (núcleo y kinetoplasto) marcadas con DAPI, permitió demostrar que los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con pTREX-GFP-TcAP1 o pTREX-GFP-TcAP2 presentan localización nuclear de las proteínas TcAP1 y TcAP2 unidas a GFP (figura 22).

7.5- PURIFICACIÓN DE LA ENDONUCLEASA RECOMBINANTE TcAP1-GFP

Columnas de agarosa asociadas a proteína G unida covalentemente a un anticuerpo ratón anti-GFP policlonal fueron incubadas con homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes expresando TcAP1-GFP, obteniéndose tres eluatos con la proteína de interés. Los eluatos fueron sometidos a ensayos de *Western blot* (figura 23). Este ensayo se realizó incubando la membrana con un anticuerpo primario monoclonal anti GFP y anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidada; posteriormente se reveló mediante quimioluminiscencia. En las primeras dos eluciones obtenidas del proceso de purificación se identificó una banda de aproximadamente 90 kDa, masa molecular mayor a la esperada de aproximadamente 73 kDa. Esta misma banda de aproximadamente 90 kDa es posible identificarla en homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados, incubados con el anticuerpo anti-GFP y anti-TcAP1 (figura 21), sugiriendo que se trata de la proteína esperada. Sin embargo, también es posible identificar una serie de bandas de menor masa molecular, que probablemente correspondan a degradación de la proteína de interés o a reacción cruzada del anticuerpo con otras proteínas. Debido a la baja eficiencia del proceso de purificación de TcAP1 utilizando esta metodología, no se realizó la purificación de TcAP2-GFP.

APE1	LKICSWNV DGLRAWIK----K-----KGL-DWVKEEAPDILCLQETKCS ENKL-PAE-
TcAP1	LKFITWNVAGLRGLLR----KDD-----QAIQRLL EEEGPDALCLQETKLN PDDPQNEK-
TcAP2	MFIISWNVAGWSSTSRMI-REDF-----GSIASF LQRTQADIVCLQEVKGSWAKL-EADP
APE1	TAYVPNAGRGL-VRLEYRQ-RWDEAFRKF LKGLAS-----RKPLVLCGDLNV
TcAP1	NTYIPNSGMSL-ERLPYRCQKFDLRI RQHLC TLGRSCNHDKEEGDAPSLAGFIWAGDLNV
TcAP2	NTYVVNAR-HG-QRMAFKM-RFLSSLKNLLTRLKKQ-----TGKPVILLGDLNQ
APE1	--QAVPLAD SFR-----HLYP-----NTPYAYTFW TYMMNARSKNVGWRLDYFL
TcAP1	--RVANAVDTFR-----ALYP-----KAA PVYTFWSARINGRARGLGWRLDYFV
TcAP2	-LHL---CDTLLVTSS SAENKAQRQEGGEAS MRVVC PYTCWDQSRNRRQRNEGTRI DYIL
APE1	-----LSHSL LPA--LCDSKIRS-----KALGSDHCPITLYL-----
TcAP1	-----VSAALARH--VDCFTMP-----HVMGSDHCPLQMWL-----
TcAP2	-----L-----PPLSTEARDVQFRGLPSTGLFVTP PQYSDHSGVCAHFD-----

Figura 2.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la endonucleasa AP de *Homo sapiens* (APE1) con las endonucleasas AP de *Trypanosoma cruzi* (TcAP1 y TcAP2).

En color rojo se muestran los aminoácidos de la región catalítica, fundamentales para la actividad AP endonucleasa, compartidos entre APE1, TcAP1 y TcAP2.

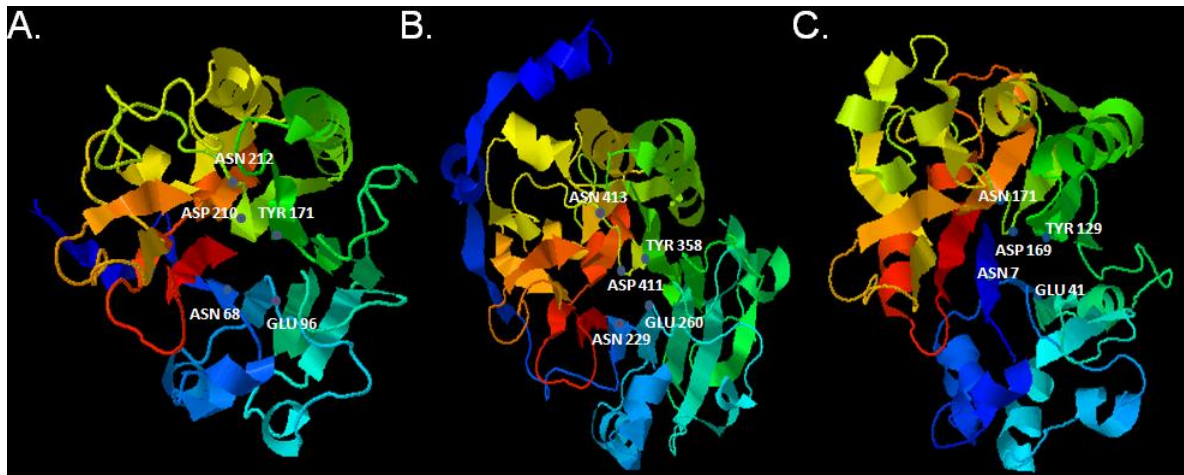


Figura 3.- Comparación de modelos tridimensionales de APE1 de *H. sapiens* con TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.

Para el modelamiento en tres dimensiones de TcAP1 y TcAP2 se utilizó el programa Phyre Version 0.2 (Imperial College of Science Tecnology and Medicine) y los resultados de la cristalografía de APE1 de *H. sapiens*. A) APE1 de *H. sapiens*; B) TcAP1 de *T. cruzi*; C) TcAP2 de *T. cruzi*.

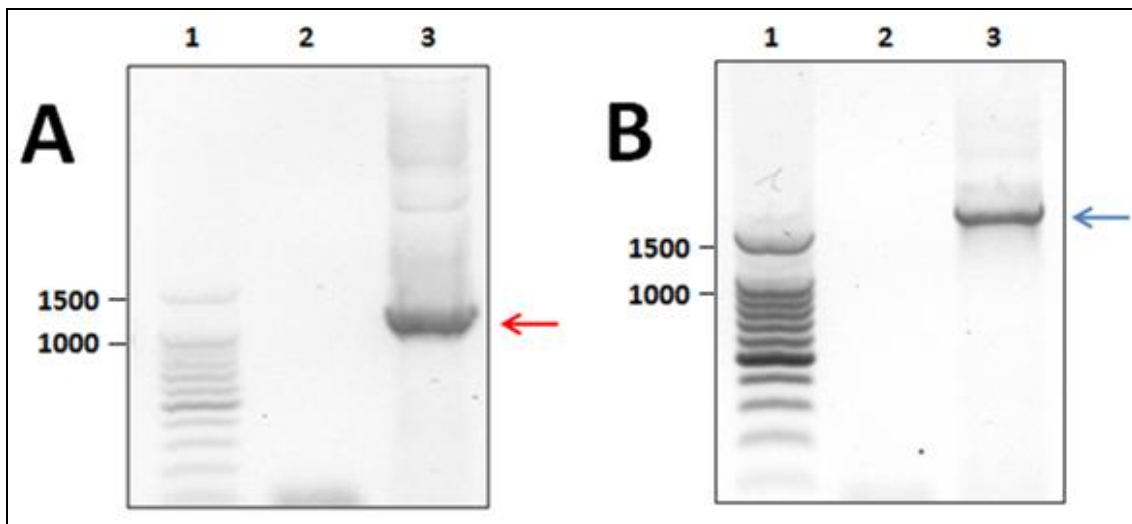


Figura 4.- Fragmentos amplificados de DNA de las secuencias nucleotídicas codificantes para las endonucleasas AP TcAP1 (A) y TcAP2 (B) de *T. cruzi*.

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: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control sin DNA; Carril 3: amplificado de DNA codificante para TcAP1 (A), tamaño esperado del amplificado de 1218 pares de bases (↔) y TcAP2 (B), tamaño esperado del amplificado de 1839 pares de bases (↔), utilizando DNA genómico de *T. cruzi* como DNA molde.

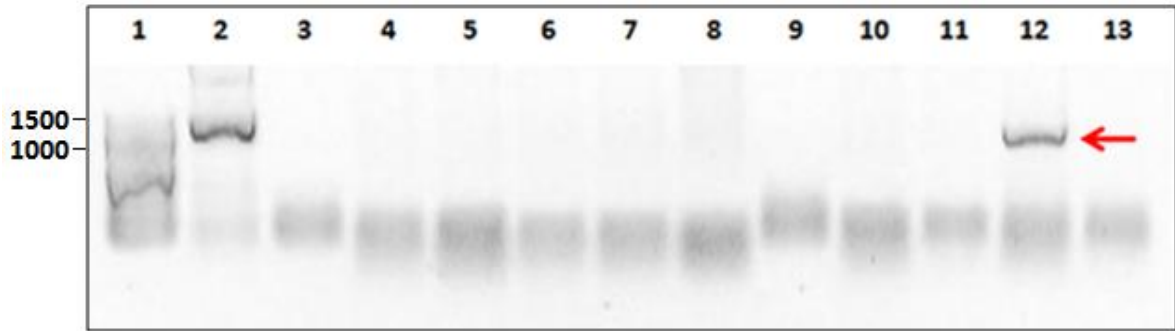


Figura 5.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP1 inserto en el vector pPICZ, mediante PCR de colonias.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control positivo (DNA genómico de *T. cruzi*); Carril 3: control sin DNA; Carriles 4 al 13: amplificados de DNA codificantes para TcAP1 utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas con el constructo pPICZ-*TcAP1*, tamaño esperado del amplificado de 1218 pares de bases (←).

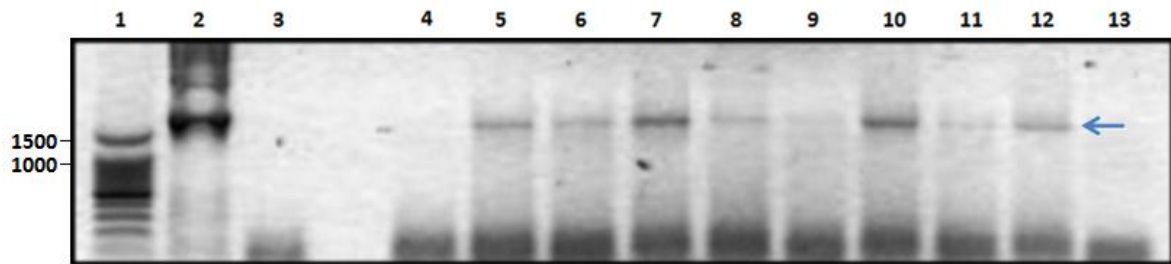


Figura 6.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP2 inserto en el vector pPICZ, mediante PCR de colonias.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control positivo (DNA genómico de *T. cruzi*); Carril 3: control sin DNA; Carriles 4 al 13: amplificados de DNA codificantes para TcAP2 utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas con el constructo pPICZ-*TcAP2*, tamaño esperado del amplificado de 1839 pares de bases (←→).

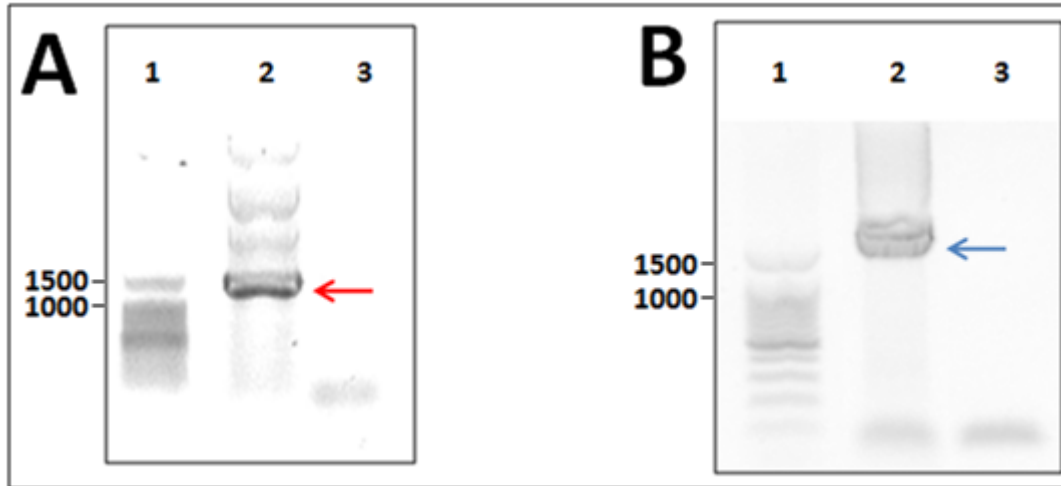


Figura 7.- Amplificados de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 (A) y TcAP2 (B) de *T. cruzi*, utilizando como DNA molde los constructos pPICZ-*TcAP1* y pPICZ-*TcAP2* purificados, respectivamente.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: amplificado de DNA codificante para TcAP1 (A, ←) o TcAP2 (B, ←) utilizando el constructo pPICZ-*TcAP1* o pPICZ-*TcAP2* como DNA molde, respectivamente (tamaño esperado del amplificado de TcAP1 de 1218 pb y de TcAP2 de 1839 pb); Carril 3: control sin DNA.

Seq1	GGCGGCCGCCAGCTTTCTAG--CAATGGGAATGCCGTCGGGACCTAAGGAACAGAAGCCG	238
L1	GGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAGCAATGGGAATGCCGTCGGGACCTAAGGAACAGAAGCCG	174

Seq1	GTTGCGGGCGGCCGGGGGAAGCGCACACGCGATCGATCCCCGTCGGCCACATCGCCGAAG	298
L1	GTTGCGGGCGGCCGGGGGAAGCGCACACGCGGTCGATCCCCGTCGGCCACATCGCCGAAG	234

Seq1	AAACCCGCCACGCGTTCCACGCGAATTCGTACGCCGACACCACCTTCCCCTCGCTAAAT	358
L1	AAACCCGCCACGCGTTCCACGCGAATTCGTACGCCGACACCACCTTCCCCTCGCTAAAT	294

Seq1	TCTGCGGGTGCAGGCGGACATCTCCCAATCGTCCCCTCGCGCCGATTGACCCGCCCG	418
L1	TCTGCGGGTGCAGGCGGACATCTCCCAATCGTCCCCTCGCGCCGATTGACCCGCCCG	354

Seq1	CCACCGTCGGACGATGACACGAGGAAGACGGAGAAGGATATTTGGAGCCAAGTGGAGCC	478
L1	CCACCGTCGGACGATGACACGAGGAAGACGGAGAAGGATATTTGGAGCCAAGTGGAGCC	414

Seq1	TTCCAGCGCCGAACAGCGCGAAGGATTCGACAGCAAACATATGCTGAAATTCATCAG	538
L1	TTCCAGCGCCGAACAGCGCGAAGGATTCGACAGCAAACATATGCTGAAATTCATCAG	474

Seq1	TGGAATGTTGCTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGACCAGGCGATCCAACGACTG	598
L1	TGGAATGTTGCTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGACCAGGCGATCCAACGACTG	534

Seq1	CTCGAGGAGGAGGGGCCGCGTGTGTCTGCAGGAACGAAGCTGAACCCGGACGAT	658
L1	CTCGAGGAGGAGGGGCCGCGTGTGTCTGCAGGAACGAAGCTGAACCCGGACGAT	594

Figura 8.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1 con el producto de la secuenciación automática del constructo pPICZ-TcAP1. Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq1:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcAP1 (GenBank access 2393782). **L1:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pPICZ-TcAP1.

Sec2	-----ATGTTTATCATTAGTTGGAATGTGGCAGGGTGGTCCT	37
L2	GCCAGCTTTCTAGAGCAATGGGAATGTTTATCATTAGTTGGAATGTGGCAGGGTGGTCCT	180

Sec2	CGACGTCCCGAATGATACGAGAGGACTTTGGAAGCATTGCATCTTTTCTGCAGCGGACTC	97
L2	CGACGTCCCGAATGATACGAGAGGACTTTGGAAGCATTGCATCTTTTCTGCAGCGGACTC	240

Sec2	AAGCGGACATGTGTTGCCTACAGGAAGTGAAGGGGTCGTGGGCAAATAGAGGCGGATC	157
L2	AAGCGGAAATGTGTTGCCTACAGGAAGTGAAGGGGTCGTGGGCAAATAGAGGCGGATC	300

Sec2	CTTGTGGTATGGGCGCCAGTGACGGCGGAAGGACGTTGGCCATCGATGGATGGGAGTCGT	217
L2	CTTGCGGTATGGGCGCAAGTGACGGCGGAAGGACGTTGGCCATCGATGGATGGGAGTCGT	360
	*** *****	
Sec2	TTTGGTCCTTCAGTGGTAAAGCACACCGTGGATTCAATGGGGTGGTGTCAATTTGTCCGGA	277
L2	TTTGGTCCTTCAGTGGTAAAGCACACCGTGGATTCAATGGGGTGGTGTCAATTTGTCCGGA	420

Sec2	AGGATCTCACATGGTGGTGTGACTCCCGTCCGTTTAGTGAAGAGGATTTGAATGATGAAG	337
L2	AGGATCTCACATGGTGGTGTGACTCCCGTCCGTTTAGTGAAGAGGATTTGAATGATGAAG	480

Sec2	GCCGTGTGATTGTACCTGCCATAGTGCCTTTGTGGTGGTGAACACGTACGTTCGTGAACG	397
L2	GCCGTGTGATTGTACCTGCCATAGTGCCTTTGTGGTGGTGAACACGTACGTTCGTGAACG	540

Sec2	CCCGTCATGGCCAACGCATGGCGTTTAAAATGCGTTTTTTGTCCAGTCTAAAAATCTTT	457
L2	CCCGTCATGGCCAACGCATGGCGTTTAAAATGCGTTTTTTGTCCAGCCTAAAAATCTTT	600

Figura 9.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP2 con el producto de la secuenciación automática del constructo pPICZ-TcAP2.

Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq2:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcAP2 (GenBank access 71654547). **L2:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pPICZ-TcAP2.

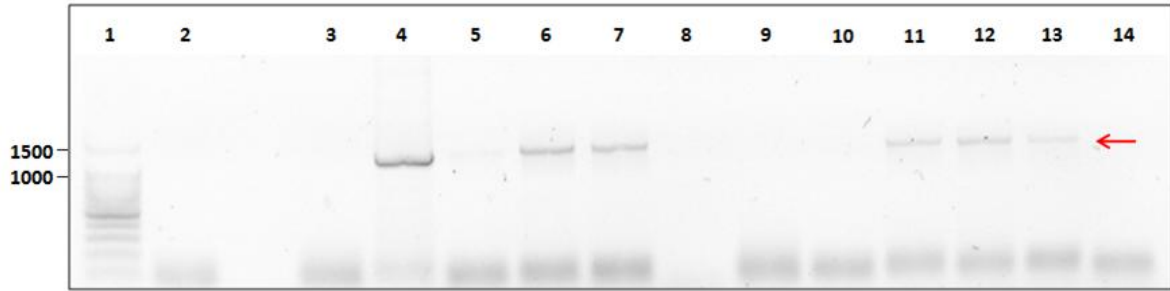


Figura 10.- Detección de amplificadores del fragmento de DNA codificante para TcAPI1 en *P. pastoris* transfectadas con el vector pPICZ-*TcAPI1*, mediante PCR de colonias de levaduras.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control sin DNA; Carril 3: producto de PCR utilizando el vector pPICZ vacío como DNA molde; Carril 4: producto PCR utilizando el constructo pPICZ-*TcAPI1* purificado como DNA molde; Carriles 5 al 14: amplificadores de DNA codificante para TcAPI1 utilizando lisados de diferentes colonias de *P. pastoris* GS115 transfectadas con el constructo pPICZ-*TcAPI1*, tamaño esperado del amplificador de 1218 pb (←).

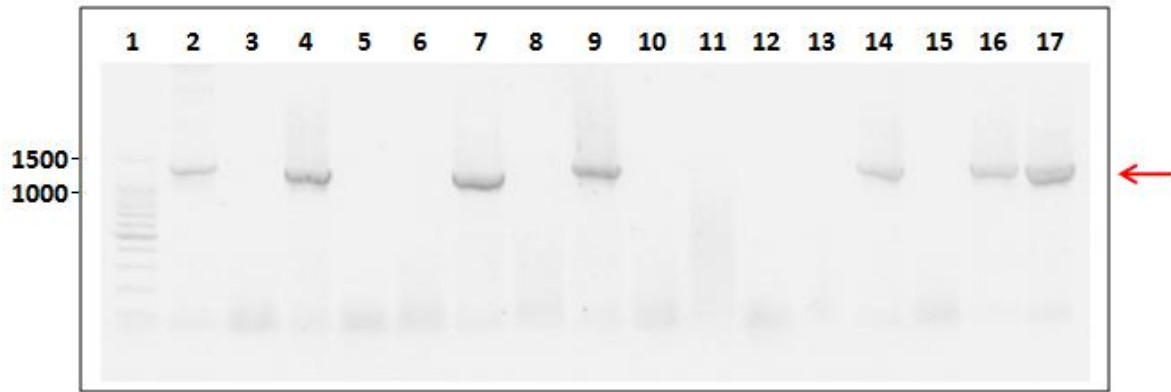


Figura 11.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP1 inserto en el vector pMT/V5, mediante PCR de colonias.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control positivo (DNA genómico de *T. cruzi*); Carril 3: control sin DNA; Carriles 4 al 17, amplificados de DNA codificante para TcAP1 utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas con el constructo pMT/V5-*TcAP1*; tamaño esperado del amplificado de 1218 pares de bases (←).

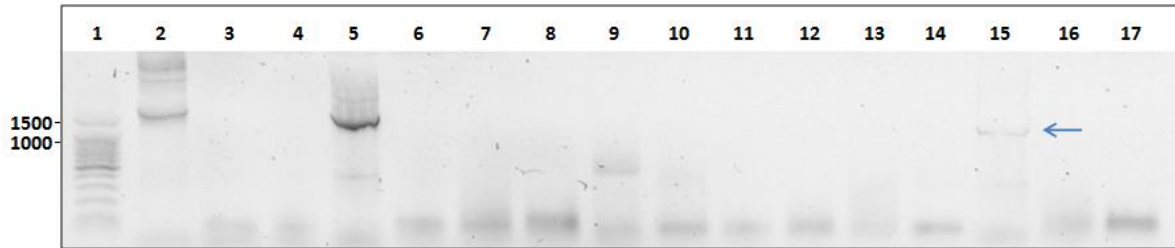


Figura 12.- Detección del fragmento de DNA codificante para TcAP2 inserto en el vector pMT/V5, mediante PCR de colonias.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control positivo (DNA genómico de *T. cruzi*); Carril 3: control sin DNA; Carriles 4 al 17, amplificados de DNA codificante para TcAP2 utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas con el constructo pMT/V5-*TcAP2*; tamaño esperado del amplificado de 1839 pb (←).

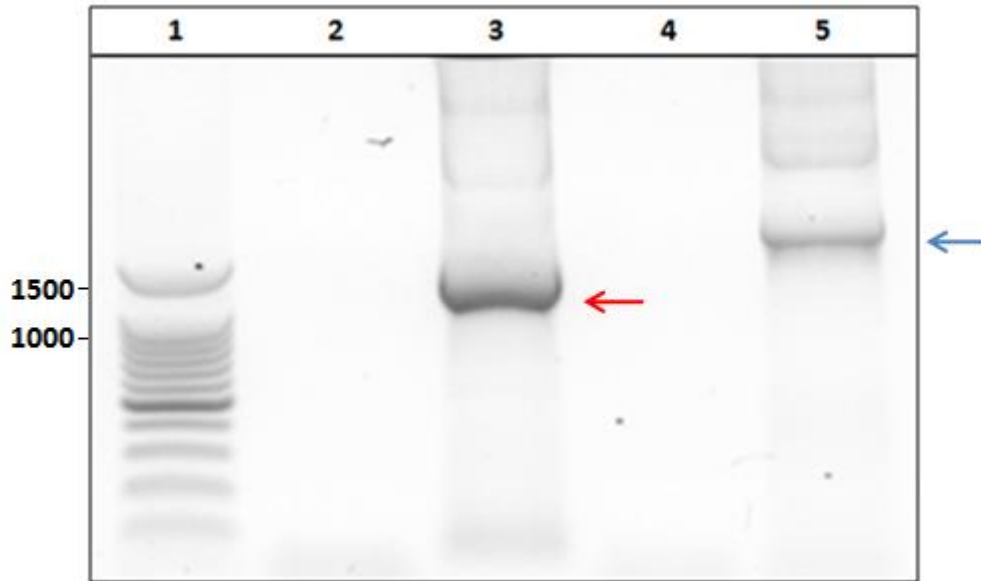


Figura 13.- Amplificados de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*, utilizando como DNA molde los constructos pMT/V5-*TcAP1* y pMT/V5-*TcAP2* purificados, respectivamente.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carriles 2 y 4: controles sin DNA; Carril 3: amplificado de DNA codificante para TcAP1 utilizando el constructo pMT/V5-*TcAP1* como DNA molde, tamaño esperado del amplificado de 1218 pb (←); Carril 5: amplificado de DNA codificante para TcAP2 utilizando el constructo pMT/V5-*TcAP2* como DNA molde, tamaño esperado del amplificado de 1839 pb (←).

Seq3	-----ATGCCGTCGGGACCTAAGG	19
L3	CAGAAGGACTAGATCGGGGTACCTACTAGTGCAATGTCGGAATGCCGTCGGGACCTAAGG	60

Seq3	AACAGAA-GCCGGTTGCGGCGGCCGGGGGAAGCGCACACGCAGTCGATCCCCGTCGGCC	78
L3	AACAGAATGCCGGTTGCGGCGGCCGGGGGAAGCGCACACGCAGTCGATCCCCGTCGGCC	120

Seq3	ACATCGCCGAAGAAACCCGCCACGCGTTCACGCGAATTCGTACGCCGACACCACCTTCC	138
L3	ACATCGCCGAAGAAACCCGCCACGCGTTCACGCGAATTCGTACGCCGACACCACCTTCC	180

Seq3	CGCTCGCTAAATTCTGCGGGTTCGGAGGCGACATCTCCAATCGTCCCCTCGCGGCCGTA	198
L3	CGCTCGCTAAATTCTGCGGGTTCGGAGGCGACATCTCCAATCGTCCCCTCGCGGCCGTA	240

Seq3	TTGACCGCCCCGCCACCGTCGGACGATGACACGAGGAAGACGGAGAAGGATATTTGGAGC	258
L3	TTGACCGCCCCGCCACCGTCGGACGATGACACGAGGAAGACGGAGAAGGATATTTGGAGC	300

Seq3	CAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCGAACAGCGCGAAGGATTTGACAGCAAACATATGCTG	318
L3	CAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCGAACAGCGCGAAGGATTTGACAGCAAACATATGCTG	360

Seq3	AAATTCATCACGTGGAATGTTGCTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGACCAGGCG	378
L3	AAATTCATCACGTGGAATGTTGCTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGACCAGGCG	420

Seq3	ATCCAACGACTGCTCGAGGAGGAGGGCCGGACGCGTGTGTCTGCAGGAAACGAAGCTG	438
L3	ATCCAACGACTGCTCGAGGAGGAGGGCCGGACGCGTGTGTCTGCAGGAAACGAAGCTG	480

Seq3	AACCCGGACGATCCACAAAATGAAAAGTTGGGCGAGGTGCCAGGGTACCGCTTCGTGCGAC	498
L3	AACCCGGACGATCCACAAAATGAAAAGTTGGGCGAGGTGCCAGGGTACCGCTTCGTGCGAC	540

Figura 14.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1 con el producto de la secuenciación automática del constructo pMT/V5-TcAP1. Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq3:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcAP1 (GenBank access 2393782). **L3:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pMT/V5-TcAP1.

```

Seq4 -----ATGTTTATCATTAGTTGGAATGTGGCAGG 29
L4 AAAGAGGACTAGATCGGGGTACCGCATGGGAATGTTTATCATTAGTTGGAATGTGGCGGG 60
*****
Seq4 GTG-GTCCTCGACGTCCCGAATGATACGAGAGGACTTTGGAAGCATTGCATCTTTCTGC 88
L4 GTGTGTCTCGACGTCCCGAATGATACGAGAGGACTTTGGAAGCATTGCATCTTTCTGC 120
*** *****
Seq4 AGCGGACTCAAGCGGACATTGTTTGCCTACAGGAAGTGAAGGGTTCGTGGGCAAATTAG 148
L4 AGCGGACTCAAGCGGAAATTGTTTGCCTACAGGAAGTGAAGGGTTCGTGGGCAAATTAG 180
*****
Seq4 AGGCGGATCCTTGTGGTATGGGCGCCAGTGACGGCGGAAGGACGTTGGCCATCGATGGAT 208
L4 AGGCGGATCCTTGTGGTATGGGCGCAAGTGACGGCGGAAGGACGTTGGCCATCGATGGAT 240
*****
Seq4 GGGAGTCGTTTTGGTCTTCAGTGGTAAAGCACACCGTGGATTCAATGGGGTGGTGCAT 268
L4 GGGAGTCGTTTTGGTCTTCAGTGGTAAAGCACACCGTGGATTCAATGGGGTGGTGCAT 300
*****
Seq4 TTGTCCGGAAGGATCTCACATGGTGGTGTGACTCCCGTCCGTTTAGTGAAGAGGATTTGA 328
L4 TTGTCCGGAAGGATCTCACATGGTGGTGTGACTCCCGTCCGTTTAGTGAAGAGGATTTGA 360
*****
Seq4 ATGATGAAGGCCGTGTGATTGTCACCTGCCATAGTGCCTTTGTGGTGGTGAACACGTACG 388
L4 ATGATGAAGGCCGTGTGATTGTCACCTGCCATAGTGCCTTTGTGGTGGTGAACACGTACG 420
*****
Seq4 TCGTGAACGCCCGTCATGGCCAACGCATGGCGTTTAAAATGCGTTTTTTGTCCAGTCTAA 448
L4 TCGTGAACGCCCGTCATGGCCAACGCATGGCGTTTAAAATGCGTTTTTTGTCCAGCTAA 480
*****
Seq4 AAAATCTTTTAACTCGGCTGAAAAGCAAACGGGTAAACCTGTCATTTTGCTAGGGGATT 508
L4 AAAATCTTTTAACTCAGCTGAAGAAGCAAACGGGTAAACCCGTCATTTTGCTAGGGGATT 540
*****

```

Figura 15.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP2 con el producto de la secuenciación automática del constructo pMT/V5-TcAP2. Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq4:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcAP2 (GenBank access 71654547). **L4:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pMT/V5-TcAP2.

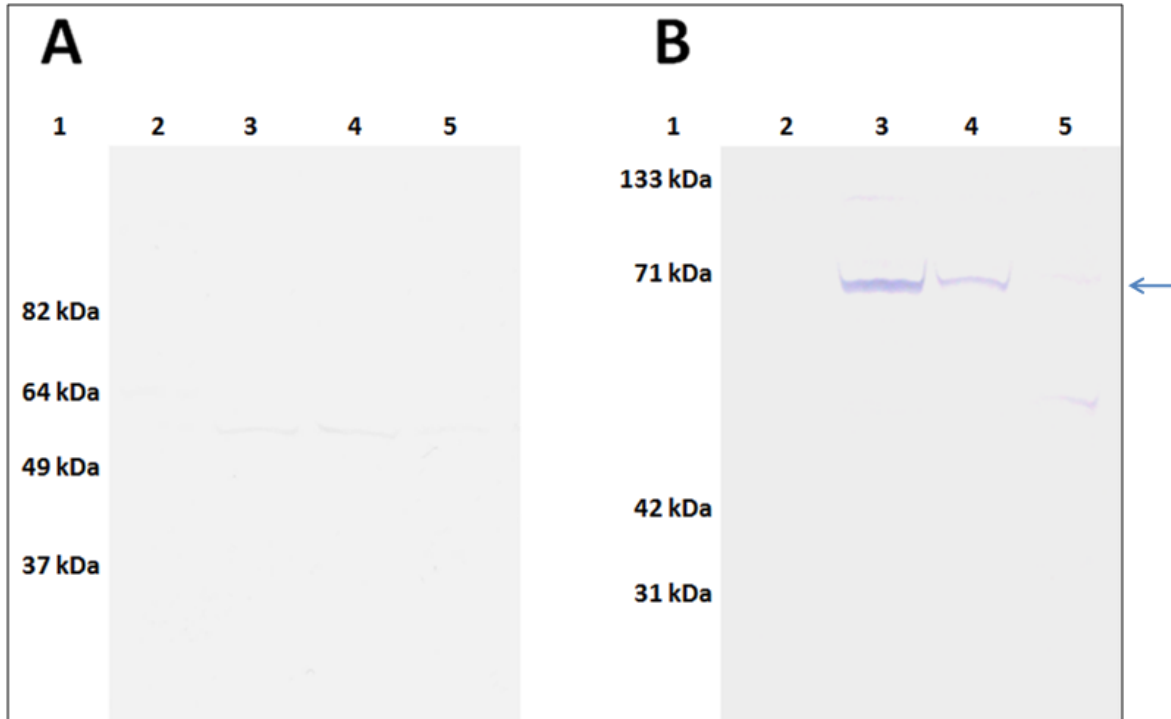


Figura 16.- Detección de las proteínas recombinantes TcAP1 (A) y TcAP2 (B) en homogeneizados de proteínas totales de células S2 de *D. melanogaster* transfectadas con los constructos pMT/V5-TcAP1 y pMT/V5-TcAP2, respectivamente.

Western blot utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti histidina (Biotech) y anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa (Jackson). El revelado se realizó adicionando los sustratos del kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). Carril 1: marcador de peso molecular en kDa (BenchMark™, Invitrogen); Carril 2: homogeneizados de proteínas totales de células S2 transfectadas, sin inducir; Carriles 3, 4 y 5: homogeneizados de proteínas totales de células S2 transfectadas, obtenidas 24, 48 y 72 horas luego de la inducción con CuSO₄ 1 mM, respectivamente. La flecha azul (←) indica las bandas que corresponden al tamaño esperado para la proteína recombinante TcAP2 (69 kDa).

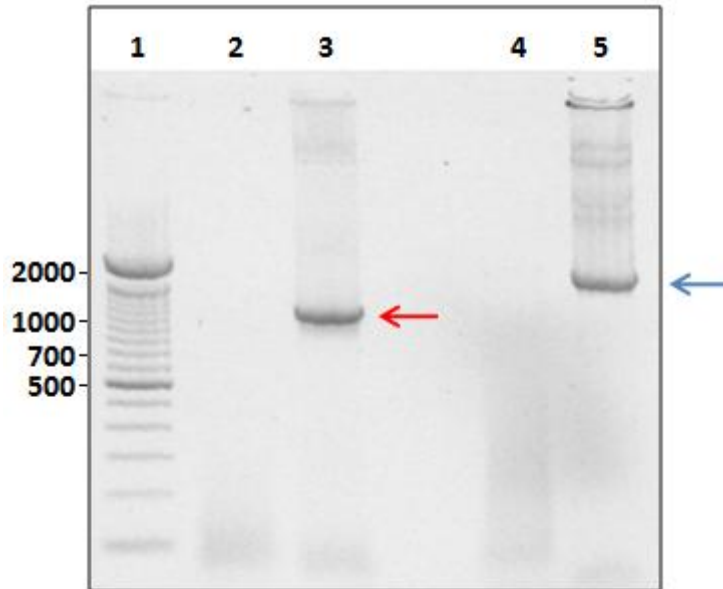


Figura 17.- Amplificados de las secuencias nucleotídicas codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*, utilizando como DNA molde los constructos pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP* purificados, respectivamente.

Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); Carriles 2 y 4: controles sin DNA; Carril 3: amplificado de DNA codificante para TcAP1 utilizando el constructo pTREX-*TcAP1-GFP* como DNA molde, tamaño esperado del amplificado de 1218 pb (←); Carril 5: amplificado de DNA codificante para TcAP2 utilizando el constructo pTREX-*TcAP2-GFP* como DNA molde, tamaño esperado del amplificado de 1839 pb (←).

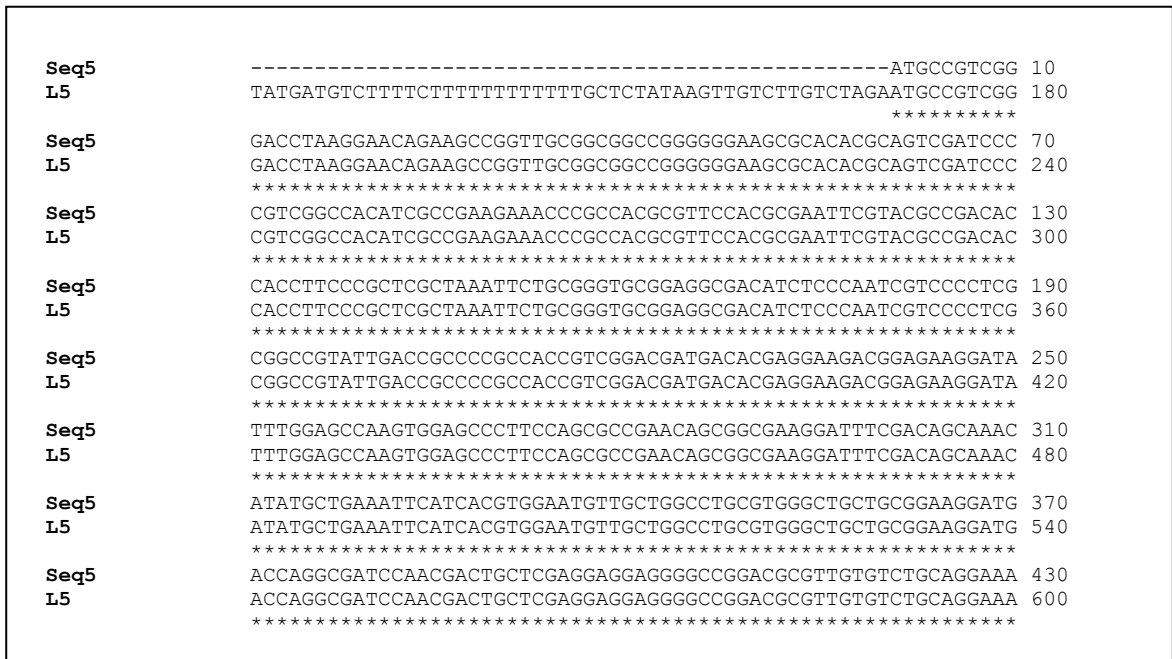


Figura 18.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1 con el producto de la secuenciación automática del constructo pTREX-TcAP1-GFP. Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq5:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcAP1 (GenBank access 2393782). **L5:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pTREX-TcAP1-GFP.

```

Seq6      -----ATGTTTATC 9
L6        TTATGATGTCTTTTCTTTTTTTTTTTTGGCTCTATAAGTTGTCTGTCTAGAATGTTTATC 180
          *****

Seq6      ATTAGTTGGAATGTGGCAGGGTGGTCCCTCGACGTCCCGAATGATACGAGAGGACTTTGGA 69
L6        ATTAGTTGGAATGTGGCGGGTGGTCCCTCGACGTCCCGAATGATACGAGAGGACTTTGGA 240
          *****

Seq6      AGCATTGCATCTTTTCTGCAGCGGACTCAAGCGGACATTGTTTGCCTACAGGAAGTGAAG 129
L6        AGCATTGCATCTTTTCTGCAGCGGACTCAAGCGGAAATGTTTGCCTACAGGAAGTGAAG 300
          *****

Seq6      GGGTCGTGGGCAAAATTAGAGGCGGATCCTTGTGGTATGGGCGCCAGTGACGGCGGAAGG 189
L6        GGGTCGTGGGCAAAATTAGAGGCGGATCCTTGTGGTATGGGCGCAAGTGACGGCGGAAGG 360
          *****

Seq6      ACGTTGGCCATCGATGGATGGGAGTCGTTTTGGTCCTTCAGTGGTAAAGCACACCGTGA 249
L6        ACGTTGGCCATCGATGGATGGGAGTCGTTTTGGTCCTTCAGTGGTAAAGCACACCGTGA 420
          *****

Seq6      TTCAATGGGGTGGTGTCAATTTGTCGGGAAGGATCTCACATGGTGGTGTGACTCCCGTCCG 309
L6        TTCAATGGGGTGGTGTCAATTTGTCGGGAAGGATCTCACATGGTGGTGTGACTCCCGTCCG 480
          *****

Seq6      TTTAGTGAAGAGGATTTGAATGATGAAGGCCGTGATGTCACCTGCCATAGTGCCTTT 369
L6        TTTAGTGAAGAGGATTTGAATGATGAAGGCCGTGATGTCACCTGCCATAGTGCCTTT 540
          *****

Seq6      GTGGTGGTGAACACGTACGTCGTGAACGCCCGTCATGGCCAACGCATGGCGTTTAAAATG 429
L6        GTGGTGGTGAACACGTACGTCGTGAACGCCCGTCATGGCCAACGCATGGCGTTTAAAATG 600
          *****

```

Figura 19.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcAP2 con el producto de la secuenciación automática del constructo pTREX-TcAP2-GFP. Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). **Seq6:** Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcAP2 (GenBank access 71654547). **L6:** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pTREX-TcAP2-GFP.

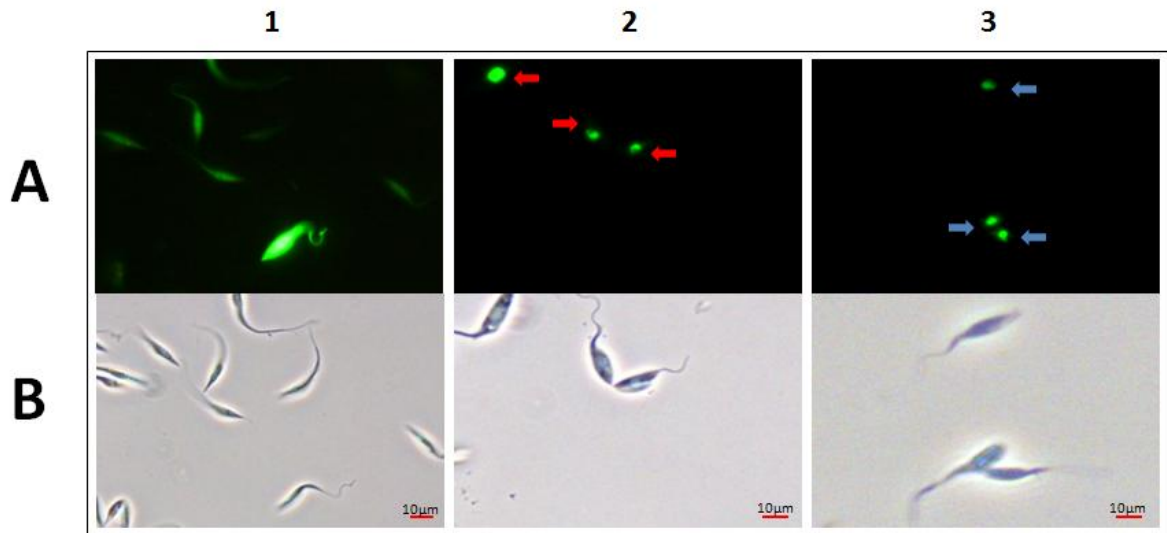


Figura 20.- Expresión de las proteínas recombinantes TcAP1-GFP y TcAP2-GFP en epimastigotes de *T. cruzi*. **A:** Detección de las proteínas de fusión por observación de epimastigotes en fresco en un microscopio de fluorescencia **B:** Epimastigotes, microscopía de contraste de fases. Columna 1: Epimastigotes control transfectados con el vector vacío pTREX-GFP; Columna 2: Epimastigotes transfectados con el constructo pTREX-TcAP1-GFP, expresando TcAP1-GFP (←→); Columna 3: Epimastigotes transformados con el constructo pTREX-TcAP2-GFP, expresando TcAP2-GFP (←→). Barras: 10 μM.

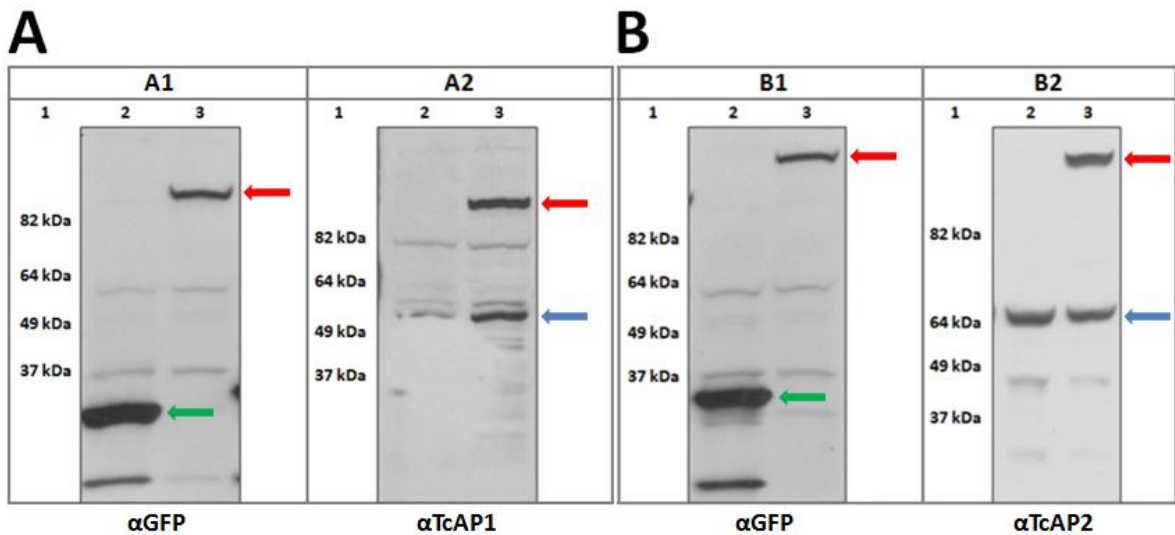


Figura 21.- Detección de las endonucleasas AP recombinantes TcAP1-GFP (A) y TcAP2-GFP (B) en epimastigotes transfectados. La detección de ambas enzimas se realizó mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti GFP (A1 y B1) o un anticuerpo primario policlonal de conejo anti TcAP1 (A2) o anti TcAP2 (B2). Posteriormente se usaron anticuerpos secundarios anti ratón o conejo conjugados a peroxidasa de rábano (Jackson). El revelado se realizó adicionando los sustratos del kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa (BenchMark™, Invitrogen); Carril 2: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transformados con el vector vacío pTREX-*GFP*, expresando GFP (←→); Carril 3: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con el constructo pTREX-*TcAP1-GFP* (A) o pTREX-*TcAP2-GFP* (B), expresando TcAP1-GFP o TcAP2-GFP (←→), respectivamente. Adicionalmente se muestra con flecha azul (←→) las bandas correspondientes a TcAP1 (A2) y TcAP2 (B2) endógeno.

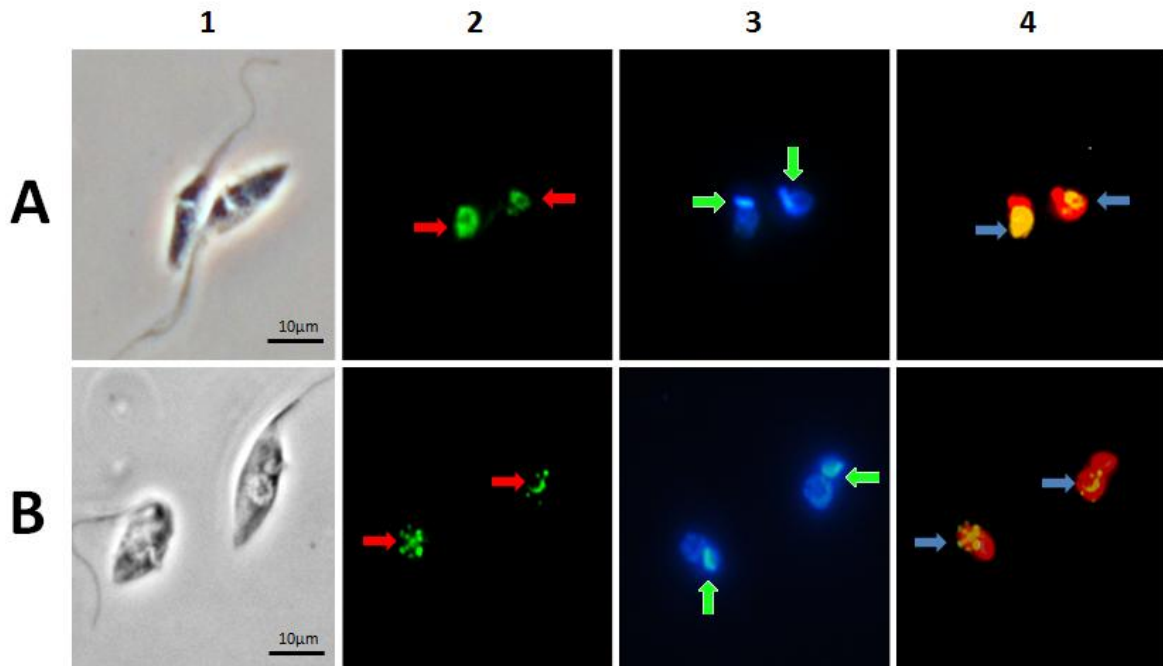


Figura 22.- Localización subcelular de las endonucleasas AP recombinantes TcAP1 y TcAP2 en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados. Immunolocalización de TcAP1-GFP (A) y TcAP2-GFP (B) en frotis de parásitos transfectados con los constructos pTREX-*TcAP1-GFP* y pTREX-*TcAP2-GFP*, respectivamente. Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti GFP (1:100 v/v) y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (1:300 v/v). Las fotografías fueron obtenidas con filtro 430 ± 20 nm para evidenciar fluorescencia azul (DAPI) y con filtro 520 ± 20 nm, que permite la identificación de fluorescencia verde (Alexa fluor 488). Las fotografías fueron procesadas computacionalmente para determinar la sobreposición de DAPI (utilizando pseudocolor rojo) con Alexa fluor 488 (verde). Columna 1: Epimastigotes transfectados, contraste de fases; Columna 2: Localización nuclear de TcAP1-GFP y TcAP2-GFP (←→); Columna 3: Localización de DNA mediante DAPI. La flecha verde (↔) indica la localización del kinetoplasto; Columna 4: Sobreposición de la fluorescencia de las columnas 2 y 3. En amarillo se observan las zonas que se sobreponen, que corresponden al núcleo del parásito (←→). Barras: 10 μM.

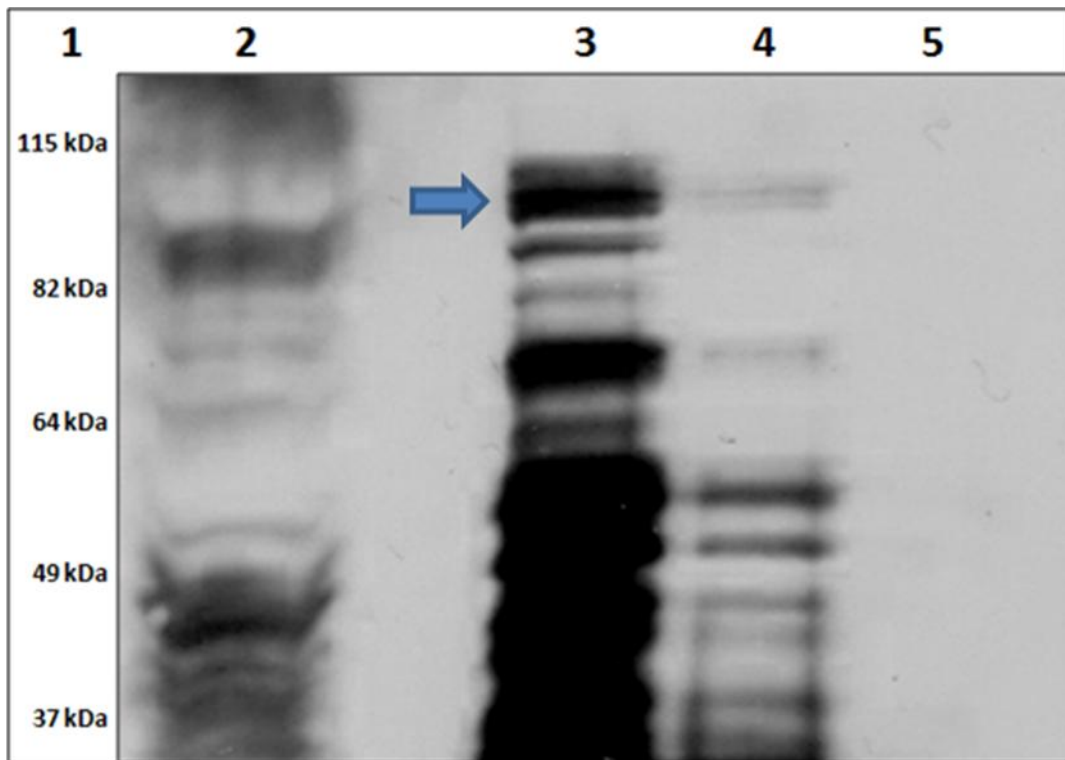


Figura 23.- Detección de proteína de masa esperada para TcAP1-GFP en purificación por cromatografía de afinidad.

Western blot utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti GFP (Thermo Scientific) y anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa (Jackson). El revelado se realizó adicionando los sustratos del kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). La purificación de TcAP1-GFP recombinante se realizó utilizando el kit comercial Pierce Crosslink Immunoprecipitation (Thermo Scientific) y un anticuerpo policlonal anti GFP. Carril 1: Marcador de peso molecular en kDa (BenchMark™, Invitrogen); Carril 2: Homogeneizado de proteínas totales de epimastigotes transfectados con pTREX-*TcAP1-GFP*, expresando TcAP1-GFP; Carril 3: Purificación de TcAP1-GFP, primera elución; Carril 4: Purificación de TcAP1-GFP, segunda elución; Carril 5: Purificación de TcAP1-GFP, tercera elución. La flecha azul (←→) indica la banda que corresponde a la masa esperada para TcAP1-GFP.

8 - DISCUSIÓN

Uno de los principales factores que condicionan el éxito o fracaso en la obtención de una proteína recombinante es la elección del modelo adecuado para la expresión exógena del gen deseado. Este éxito no sólo recae en que se consiga expresar la proteína de interés, sino también en la cantidad y la calidad de la proteína recombinante generada (Greene, 2004).

La expresión de la proteína puede verse alterada debido a cambios en el marco de lectura del gen recombinante o por problemas de inestabilidad del constructo (vector) dentro de la célula donde se desea expresar la proteína de interés. Esto último se ha asociado a una pérdida en las unidades de vector a repartir entre las células hijas durante la división celular. Las alteraciones en la estabilidad de los vectores pueden resultar en una completa anulación de la producción de la proteína recombinante o en la acumulación de proteínas recombinantes aberrantes con cambios en su secuencia aminoacídica original (deleciones, adiciones, o sustituciones). Dentro de los parámetros que influyen la estabilidad de los vectores se encuentran: el tamaño de estos (vectores de mayor tamaño son menos estables), la tasa de proliferación celular, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura en que es mantenido el cultivo celular (Palomares *et al.*, 2004).

Por otra parte, el proceso de traducción del mRNA del gen exógeno es otro punto importante al momento de seleccionar un modelo celular de expresión. El código genético determina cuál de los 61 tripletes o codones es traducido a un residuo específico dentro de los 20 aminoácidos existentes. Debido a que hay más codones que aminoácidos, el código genético es necesariamente redundante. Mientras algunos aminoácidos son codificados por un solo codón, la mayoría de los aminoácidos son codificados por dos a seis codones diferentes. Así, codones diferentes que codifican el mismo aminoácido se conocen como codones sinónimos. Sin embargo, se ha demostrado en una amplia variedad de especies que los codones sinónimos se utilizan con diferente frecuencia. Por lo tanto el uso de codones en mayor o menor frecuencia para un aminoácido específico difiere entre especies. Este fenómeno ha sido denominado sesgo del uso de codones (Angov, 2011; Hershberg y Petrov, 2008).

Indagaciones realizadas por Grantham *et al.* (1980), señalan que existe directa relación entre la frecuencia del uso de codones, la concentración de tRNAs específicos y el nivel de traducción de la proteína recombinante. La frecuencia del uso de codones de

un organismo no es azarosa, la mayoría de los genes siguen en mayor o menor grado las tendencias genómicas del uso de codones. Así, genes altamente expresados utilizan generalmente los mismos codones para codificar un tipo de aminoácido, lo que se correlaciona significativamente con las especies de tRNA más abundantes (Ikemura, 1982; Robinson *et al.*, 1984).

Por lo anteriormente mencionado, durante la traducción de la proteína recombinante pueden generarse problemas a causa de una variedad insuficiente o limitada de ciertos tRNAs en la célula escogida para expresar, disminuyendo así la traducción del mRNA del gen exógeno. Esta sobre exigencia del sistema traduccional de la célula lleva, además, a la reducción del índice proliferativo, y puede manifestarse como una respuesta tóxica general (Greene, 2004).

Otro factor de importancia, al momento de generar proteínas funcionales a partir de un gen exógeno, es la solubilidad de las proteínas recombinantes (Tartaglia *et al.*, 2009). La solubilidad está directamente relacionada con el correcto plegamiento de la estructura polipeptídica de la proteína (Choi *et al.*, 2008). La sobreexpresión de proteínas recombinantes puede llevar a la generación de productos insolubles (Palomares *et al.*, 2004), lo que se ha evidenciado para gran número de proteínas de mamífero que se ha intentado expresar en bacterias *E. coli*, en donde solo se han obtenido cuerpos de inclusión insolubles (Iafolla *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2002).

Si bien los modelos de expresión de proteínas en procariontes entregan gran versatilidad, en numerosos casos presentan severas limitantes al momento de expresar genes de eucariontes. Esto último se relaciona principalmente con las modificaciones post-traduccionales específicas requeridas por las proteínas eucariontes para un correcto plegamiento y funcionalidad. Estas modificaciones incluyen cortes proteolíticos, glicosilación y otras modificaciones aminoacídicas, entre otras (Brondyk, 2009; Greene, 2004). Es por ello que la versatilidad de los sistemas de expresión procariontes puede ser insuficiente, haciendo necesario el uso de sistemas de expresión eucariontes para obtener un producto biológico activo.

Experimentos previos realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile determinaron que la expresión de la proteína recombinante TcAP1 en *E. coli* resultó ser tóxica para las bacterias, probablemente debido a alguno de los factores mencionados previamente. A su vez, la expresión de TcAP2 en el modelo bacteriano indujo la formación de cuerpos de inclusión insolubles

y por lo tanto, no fue posible obtener la proteína en condiciones nativas para determinar su actividad *in vitro*.

En esta Memoria de Título se procedió a generar vectores de expresión para ser usados en diferentes modelos de expresión eucariontes. A pesar de los múltiples intentos de expresar TcAP1 y TcAP2 en los modelos de expresión de *P. pastoris* y células de insecto S2, sólo fue posible detectar la expresión de bajos niveles de TcAP2 en este último modelo celular. Los resultados entregados en las secuenciaciones automáticas de los constructos pPICZ-*TcAP1/TcAP2*, pMT/V5-*TcAP1/TcAP2* y pTREX-*TcAP2* muestran la presencia de deleciones nucleotídicas en las secuencias obtenidas, lo que produciría un cambio en el marco de lectura de los genes codificantes para TcAP1 y TcAP2 recombinantes. Este podría ser el factor que determina la ausencia de expresión de las proteínas recombinantes. Sin embargo, el hecho de obtener expresión de la endonucleasa AP TcAP2 recombinante en el modelo de expresión de *T. cruzi*, y una baja expresión de TcAP2 recombinante en el modelo de *D. melanogaster*, permite suponer que esto no sería el factor que explica la falta de expresión de TcAP1 y TcAP2 en el modelo de *P. pastoris* y de TcAP1 en *D. melanogaster*.

Por otro lado, la ausencia de colonias en levaduras *P. pastoris* transfectadas con pPICZ-*TcAP2* podría relacionarse a un problema en el proceso de electroporación que no permitiera el paso del DNA linealizado al interior de las levaduras. Esto último se podría deber a una falla en el proceso de elaboración de las levaduras electrocompetentes utilizadas para este experimento.

El fracaso de los modelos de *P. pastoris* y *D. melanogaster* para la expresión de las endonucleasas AP de *T. cruzi* podría relacionarse a problemas en el uso de codones, con el consecuente término prematuro de la traducción de la proteína, tal como ha sido descrito para la expresión de proteínas recombinantes de mamífero en modelos de eucariontes ancestrales (Angov, 2011; Daly y Hearn, 2005; Greene, 2004; Hershberg y Petrov, 2008). Una segunda explicación podría involucrar algunos problemas en la generación de modificaciones post-traduccionales específicas de *T. cruzi* de ambas endonucleasas AP que generan un plegamiento incorrecto de las proteínas, con la consecuente degradación de estas (Greene, 2004).

Una serie de estudios indican que para la obtención de proteínas recombinantes es recomendable el uso de modelos celulares homólogos, o al menos filogenéticamente muy similares a las células de las cuales proviene el gen exógeno que codifica la proteína de interés (Greene, 2004; Hamsch *et al.*, 2010).

Lo anteriormente mencionado se refleja en los resultados de esta Memoria de Título, en la que se logró expresar de manera constitutiva ambas endonucleasas AP, como proteínas de fusión a GFP, en epimastigotes de *T. cruzi*. Esto fue corroborado mediante ensayos de *Western blot*, utilizando anticuerpos primarios anti GFP o anti TcAP1 y anti TcAP2, así como por observación directa de la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente verde en los parásitos transfectados, mediante microscopía de fluorescencia. El éxito de la expresión de ambas proteínas recombinantes en *T. cruzi* se explica considerando que ambas enzimas de reparación del DNA son propias del parásito. En efecto, el parásito posee la maquinaria enzimática y los recursos celulares necesarios para llevar a cabo de manera adecuada la traducción y las modificaciones post-traduccionales necesarias para la obtención de ambas endonucleasas AP recombinantes.

Debido a que la emisión de fluorescencia de los parásitos transfectados con ambas endonucleasas AP se limita a un área específica del epimastigote, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo primario anti GFP y se determinó que tanto TcAP1-GFP como TcAP2-GFP se encuentran exclusivamente en el núcleo parasitario. Estos resultados difieren ostensiblemente de lo que ocurre con la endonucleasa AP APE1 en células de mamífero. En estos, se ha observado que la localización de APE1 es citoplasmática, translocándose al núcleo sólo luego de la exposición a agentes genotóxicos, siendo esenciales los primeros 20 residuos aminoacídicos del extremo amino terminal (Mitra *et al.*, 2002). APE1 también juega un rol en la mantención de la integridad del genoma mitocondrial. En este último caso, la remoción de los primeros 33 residuos aminoacídicos del extremo amino terminal favorece la translocación de la enzima a la mitocondria (Chattopadhyay *et al.*, 2006). De manera similar, el daño al DNA induce la redistribución de APE1 a la mitocondria (Mitra *et al.*, 2002).

No fue posible detectar TcAP1-GFP y TcAP2-GFP en el kinetoplasto parasitario, incluso luego de incubaciones con agentes oxidantes (datos no mostrados). Nuestros resultados sugieren que TcAP1-GFP y TcAP2-GFP cumplen una función exclusivamente en el núcleo del parásito.

La purificación vía inmunoafinidad utilizando anticuerpos anti GFP ha sido descrita previamente (Zhuang *et al.*, 2008). Basados en estos antecedentes, en esta Memoria de Título se procedió a purificar la endonucleasa AP recombinante TcAP1-GFP en columnas de agarosa asociadas a proteína G unida covalentemente a un

anticuerpo policlonal de ratón anti-GFP. Además de una banda específica, se observó un importante número de otras proteínas, hecho que podría deberse a una degradación de la proteína de interés o a reacciones cruzadas de otras proteínas con el anticuerpo.

Estos resultados hacen evidente la importancia de utilizar un modelo celular de expresión de características filogenéticas similares a *T. cruzi*, para asegurar un adecuado proceso de traducción y de cambios post-traduccionales que lleven a la obtención de estas proteínas recombinantes posiblemente en estado funcional. Además, es necesario que este sistema de expresión genere proteínas con marcadores moleculares que permitan una mayor especificidad al momento de la purificación, como el uso de secuencias de polihistidinas, para así asegurar la obtención de la proteína recombinante pura (Loughran y Walls, 2011; Xu *et al.*, 1998). Actualmente en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile se trabaja con un modelo de expresión en *Leishmania tarentolae*, perteneciente a la misma familia de *T. cruzi* (Trypanosomatidae), para expresar TcAP1 y TcAP2. Por otra parte, se realizó una modificación del vector pTREX de *T. cruzi* para incorporar una secuencia nucleotídica codificante para una cola de 8 histidinas asociadas a las proteínas de fusión resultantes. Esta vertiente experimental surgió, en gran medida, a partir de los resultados de la presente Memoria.

9 – RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se logró insertar las secuencias codificantes para TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi* en los vectores de expresión de *P. pastoris*, *D. melanogaster* y *T. cruzi*.
2. En el modelo de expresión de *P. pastoris* no se logra la expresión de las endonucleasas AP recombinantes TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*.
3. En el modelo de expresión de *D. melanogaster* sólo se obtiene una baja expresión de la endonucleasa AP recombinante TcAP2 de *T. cruzi*.
4. En el modelo de expresión de *T. cruzi* se logra la expresión de las endonucleasas AP recombinantes TcAP1-GFP y TcAP2-GFP de *T. cruzi*, así como la purificación parcial de TcAP1-GFP.
5. TcAP1-GFP y TcAP2-GFP se localizan en el núcleo de los epimastigotes recombinantes, indicando homología estructural entre las endonucleasas recombinantes y las endógenas del parásito.
6. La purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando proteínas marcadas con GFP, no permite la obtención pura de las proteínas de interés. Se requiere de otro marcador molecular, actualmente en investigación en el laboratorio.

10 - CONCLUSIÓN

Para una correcta expresión de las endonucleasas AP TcAP1 y TcAP2 de *T. cruzi*, se requiere de un modelo celular que comparta las características celulares y moleculares de la célula de origen. Además, el uso de GFP como marcador molecular de estas endonucleasas permite su identificación pero no la obtención pura de estas proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Los resultados de esta Memoria de Título abrieron el camino para la obtención de proteínas recombinantes en *T. cruzi*, permitiendo la producción, purificación y ensayos funcionales de diferentes enzimas importantes en la reparación del DNA parasitario frente a agresiones con agentes oxidantes.

10 - BIBLIOGRAFÍA

1. **ABRAMSON, C.I.; ROMERO, E.S.; FRASCA, J.; FEHR, R.; LIZANO, E.; ALDANA, E.** 2005. Psychology of learning: a new approach to study behavior of *Rhodnius prolixus* stal under laboratory conditions. *Psychol Rep.* 97(3):721-31.
2. **ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER P.** 2010. *Biología Molecular de la Célula*. 5ta ed. Ediciones Omega S.A., Barcelona. Capítulo 8, pp 501-578.
3. **ANDRADE, L.; ANDREWS N.** 2005. The *Trypanosoma cruzi* host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. Doi:10.1038/nrmicro1249.
4. **ANGOV, E.** 2011. Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol J.* 6(6):650-9. doi: 10.1002/biot.201000332. Epub 2011 May 12.
5. **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.
6. **BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.** 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair.* 3(8-9):1109-1115.
7. **BRONDYK, W.H.** 2009. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol.* 463:131-147.
8. **BURGESS, R.R.** 2009. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.* 463:259-82.B
9. **BURKOVICS, P.; SZUKACSOV, V.; UNK, I.; HARACSKA, L.** 2006. Human Ape2 protein has a 3' – 5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res* 34(9):2508-2515.
10. **CABRERA G.; BARRÍA C.; FERNÁNDEZ C.; SEPÚLVEDA S.; VALENZUELA L.; KEMMERLING U.; GALANTI N.** 2011. DNA repair BER pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem.* 112(8):2189-2199.
11. **CARVAJAL, A.; ORELLANA, J.; WIGANT, W.; BÓRQUEZ, C.; LOBATO, I.** 2007. Prevalencia de triatomíneos infectados con *Trypanosoma cruzi* en el litoral de la ciudad de Arica. *Parasitol Latinoam.* 62(3-4): 118-121.
12. **CAVALIER-SMITH.** 1993. T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* (4): 953-994.

13. **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.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap15/>> Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. México. [consulta: 25 de julio de 2010].
14. **CHAGAS, C.** 1909. Neue Trypanosomen. Arch. Schiffs Tropenhyg. 13: 120-122.
15. **CHATTOPADHYAY, R.; WIEDERHOLD, L.; SZCZESNY, B.; BOLDOGH, I.; HAZRA, T.K.; IZUMI, T.; MITRA, S.** 2006. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 34(7):2067-76.
16. **CHOI, S.I.; HAN, K.S.; KIM, C.W.; RYU, K.S.; KIM, B.H.; KIM, K.H.; KIM, S.I.; KANG, T.H.; SHIN, H.C.; LIM, K.H.; KIM, H.K.; HYUN, J.M.; SEONG, B.L.** 2008. Protein Solubility and Folding Enhancement by Interaction with RNA. PLoS One. 3(7):e2677.
17. **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.
18. **CREGG, J.M.; CEREGHINO, J.L.; SHI, J.; HIGGINS, D.R.** 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol. 16(1):23-52.
19. **CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L.** 2004. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infect Immun., 72, 4081-4089.
20. **DALY, R.; HEARN, M.T.** 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit. 18(2):119-38.
21. **DE SOUZA, W.** 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current Pharmaceutical Design. 8(4): 269-285.
22. **DEMPLE, B.; SUNG, J.S.** 2005. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. DNA Repair. 4(12): 1442-9.
23. **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.
24. **GALANTI, N.; GALINDO, M.; SABAJ, V.; ESPINOZA, I.; TORO, G.C.** 1998. Histone genes in trypanosomatids. Parasitol Today. 14(2):64-70.

25. **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 bloodfeeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol.* 36, 322-335.
26. **GRANTHAM, R.; GAUTIER, C.; GOUY, M.; MERCIER, R.; PAVÉ, A.** 1980. Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res.* 8(1):r49-r62.
27. **GREENE, J.J.** 2004. Host cell compatibility in protein expression. *Methods in Molecular Biology*, vol. 267: Recombinant Gene Expression: reviews and protocols, Second Edition. Edited by: BALBÁS, P.; LORENCE, A. pp. 3-14.
28. **HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219(1): 1-14.
29. **HAMBSCH, N.; SCHMITT, G.; JENDROSSEK, D.** 2010. Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas sp.* *J Appl Microbiol.* 109(3):1067-75. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04732.x.
30. **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.
31. **HERSHBERG, R.; PETROV, D.A.** 2008. Selection on codon bias. *Annu Rev Genet.* 42:287-99.
32. **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.
33. **IAFOLLA, M.A.; MAZUMDER, M.; SARDANA, V.; VELAUTHAPILLAI, T.; PANNU, K.; MCMILLEN, D.R.** 2008. Dark proteins: effect of inclusion body formation on quantification of protein expression. *Proteins.* 72(4):1233-42.
34. **IDE, H.; KOTERA, M.** 2004. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull.* (4):480-5.
35. **IKEMURA, T.** 1982. Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes. Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and *Escherichia coli* with reference to the abundance of isoaccepting transfer RNAs. *J Mol Biol.* 158(4):573-97.

36. **KUMAR, P.; BHARTI, S.K.; VARSHNEY, U.** 2011. Uracil excision repair in *Mycobacterium tuberculosis* cell-free extracts. *Tuberculosis (Edinb)*. 91(3):212-8. Epub 2011 Mar 2.
37. **LORENZI, H.A.; VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J.** 2003. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 310:91-9.
38. **LOUGHRAN, S.T.; WALLS, D.** 2011. Purification of poly-histidine-tagged proteins. *Methods Mol Biol*. 681:311-35.
39. **LUDWIG, D.L.; MACINNES, M.A.; TAKIGUCHI, Y.; PURTYMUN, P.E.; HENRIE, M.; FLANNERY, M.; MENESES, J.; PEDERSEN, R.A.; CHEN, D.J.** 1998. A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation embryonic progression and ionizing radiation sensitivity. *Mutat Res*. 409(1):17-29.
40. **LUKES, J.; HASHIMI, H.; ZÍKOVÁ, A.** 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*. 48(5): 277-299.
41. **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.
42. **McCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z.; BUCK, G.** 1989. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 82(1): 177-189.
43. **MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2007. Boletín de Vigilancia en Salud Pública de Chile. 10(25).
44. **MITRA, S.; IZUMI, T.; BOLDOGH, I.; BHAKAT, K.K.; HILL, J.W.; HAZRA, T.K.** 2002. Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. *Free Radic Biol Med*. 33(1):15-28.
45. **OIE-WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH.** 2009. Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas). [en línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tripanosomiasis_americana_chagas.pdf> [consulta: 28-11-09].
46. **OLEA, A.** 2009. Zoonosis y Enfermedades de transmisión vectorial. Boletín de Vigilancia en Salud Pública. 10 N° 25 ISSN 0717 – 392p.
47. **PALOMARES, L.A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O.T.** 2004. Production of recombinant proteins. *Methods in Molecular Biology*, vol. 267:

- Recombinant Gene Expression: reviews and protocols, Second Edition. Edited by: BALBÁS, P.; LORENCE, A. pp. 15-51.
48. **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, 771-777.
 49. **PRATA, A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1(2): 92-100.
 50. **RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.** 2010. Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 375: 1388-1402.
 51. **RIBAR, B.; IZUMI, T.; MITRA, S.** 2004. The major role of human AP-endonuclease homolog Apn2 in repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 32(1):115-126.
 52. **RILEY, P.A.** 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 65, 27-33.
 53. **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.
 54. **ROBINSON, M.; LILLEY, R.; LITTLE, S.; EMTAGE, J.S.; YARRANTON, G.; STEPHENS, P.; MILLICAN, A.; EATON, M.; HUMPHREYS, G.** 1984. Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 12(17):6663-71.
 55. **RODRIGUES COURA, J.; DE CASTRO, S.L.** 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 1, 3-24.
 56. **SCHMUNIS, G.; YADON, Z.** 2009. Chagas disease: A Latin American Health problem becoming a world health problem. *Act Trop.* 2436:8.
 57. **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.
 58. **SOSA, S.; SEGURA, E.; RUIZ, A.; VELÁSQUEZ, E.; PORCEL, B.; YAMPOTIS, C.** 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4, 526-529.

59. **SOUZA, L.L.; EDUARDO, I.R.; PÁDULA, M.; LEITÃO, A.C.** 2006. Endonuclease IV and exonuclease III are involved in the repair and mutagenesis of DNA lesions induced by UVB in *Escherichia coli*. *Mutagenesis*. 21(2):125-30.
60. **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.
61. **SRINIVASAN, S.; BARNARD, G.C.; GERNGROSS, T.U.** 2002. A novel high-cell-density protein expression system based on *Ralstonia eutropha*. *Appl Environ Microbiol*. 68(12):5925-32.
62. **TANIHIGASHI, H.; YAMADA, A.; IGAWA, E.; IKEDA, S.** 2006. The role of *Schizosaccharomyces pombe* DNA repair enzymes Apn1p and Uve1p in the base excision repair of apurinic/aprimidinic sites. *Biochem Biophys Res Commun* 347(4):889-894.
63. **TARTAGLIA, G.G.; PECHMANN, S.; DOBSON, C.M.; VENDRUSCOLO, M.** 2009. A relationship between mRNA expression levels and protein solubility in *E. coli*. *J Mol Biol*. 388(2):381-9. Epub 2009 Mar 10.
64. **TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N.** 2006. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(5).
65. **TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A.** 2008. Chagas disease. *Postgrad Med J*. 82:788-798.
66. **TORO, G.C.; GALANTI, N.** 1988. H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Cell Res*. 174(1): 16-24.
67. **TOSO, M.A.; VIAL, U.F.; GALANTI, N.** 2011. Oral transmission of Chagas' disease. *Rev Med Chil*. 139(2):258-66. Epub 2011 Jul 11.
68. **TYLER, K.; ENGMAN, D.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 31(5-6): 472-481.
69. **URBINA, J.; DOCAMPO, R.** 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 19(11): 495-501.
70. **VAZQUEZ, M.P.** 2007. The genetics and genomics of *Trypanosoma cruzi*. *Intl. J. Biomed. Pharma. Sci*. 1(1):1-11.
71. **WHO EXPERT COMMITTEE.** 2002. Second Report on the control of Chagas disease, Technical Report Series 905, Geneva, 85 pp. [en línea] <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf> [consulta: 20-11-11].

72. **WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2007. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. [en línea] <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas>> [consulta: 20-11-11].
73. **XU, W.; SIMONS, F.E.; PENG, Z.** 1998. Expression and rapid purification of an *Aedes aegypti* salivary allergen by a baculovirus system. *Int Arch Allergy Immunol.* 115(3):245-51.
74. **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.
75. **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.
76. **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, 695- 715.
77. **ZAWAHIR, Z.; DAYAM, R.; DENG, J.; PEREIRA, C.; NEAMATI, N.** 2009. Pharmacophore guided discovery of small-molecule human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 inhibitors. *J Med Chem.* 52(1):20-32.
78. **ZHUANG, R.; ZHANG, Y.; ZHANG, R.; SONG, C.; YANG, K.; YANG, A.; JIN, B.** 2008. Purification of GFP fusion proteins with high purity and yield by monoclonal antibody-coupled affinity column chromatography. *Protein Expr Purif.* 59(1):138-43. Epub 2008 Feb 8.
79. **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.