



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



**“PARTICIPACIÓN DE LAS DNA GLICOSIDASAS TcNTH1 Y TcOGG1 DE *Trypanosoma cruzi* EN LA RESISTENCIA AL DAÑO OXIDATIVO DEL DNA”**

**SANTIAGO DAVID RAMÍREZ ARÉVALO**

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

**PROFESOR GUÍA: GONZALO CABRERA VALLEJOS**

**SANTIAGO – CHILE  
2012**

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

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

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

- FONDECYT 1090124

- FONDECYT 11100053

- Proyecto Bicentenario Anillo ACT 112

## DEDICATORIA

*A mi Familia, y amigos.*

## AGRADECIMIENTOS

Es difícil, en tan poco espacio plasmar el sentimiento que genera en mí llegar a este punto de mi formación.

Tuve la suerte de crecer junto a ejemplos de bondad, preocupación y entrega, a quienes debo toda mi formación personal, y si la paciencia se pudiera pagar, estaría hipotecando mi vida entera para pagarles, gracias Papá Raúl, gracias Tata Max y Mamá Fanny.

Agradezco especialmente a mi madre, que desde pequeño estuvo entregada a mi formación, sin duda puedo decir que tengo la mejor madre del mundo.

Gracias Berny, por tu inmenso cariño, amor, apoyo, y gran incondicionalidad. Agradezco con gran énfasis a mi Tío Gonzalo, por su gran ahínco en enseñarme a pensar, sembrando en mí el interés en las ciencias desde mi etapa escolar. Agradezco a mis hermanos chicos Raúl y Matías por soportarme todos estos años.

Agradezco al profesor Norbel, por su calidad como persona, y hombre de ciencias, a mi profesor guía y amigo, Gonzalo, por la gran paciencia, por los consejos, por demostrarme que en el laboratorio no solo hay equipos, investigadores y proyectos, sino una gran familia, cuyos objetivos son claros. Gracias Gonzalo, reitero, por tu amistad, y gran paciencia y calidad humana. Gracias amiga Sofy, por tu cariño, infinita disposición y paciencia para explicarnos no una, sino varias veces las cosas, gracias pequeña Naty, tu alegría y carácter te caracterizan y se transmiten. Iván, Paula, Gilda, y Sole, gracias por su apoyo y buena onda, Gracias Lucy por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, gracias compadre y amigo Libe, por continuar entregándome el apoyo, las tallas y la alegría que te caracterizaron durante todos los años que compartimos dentro y fuera de la universidad. Agradezco también a mi familia adoptiva Gonzales Kaelin, por su gran apoyo y acogida en su hogar durante los momentos más difíciles de mi estudio.

Sin duda, soy un hombre afortunado, tengo grandes amigos, grandes mentores, dos familias y una banda de rock, Gracias Andy, Blas y Xarly, gracias a todos por acompañarme, tolerar mi carácter y ser incondicionales.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>FUENTES DE FINANCIAMIENTO .....</b>	<b>2</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>4</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>1- INTRODUCCION .....</b>	<b>13</b>
<b>2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 EPIDEMIOLOGÍA .....	14
2.2 ETIOLOGÍA .....	15
2.3 SIGNOS CLÍNICOS Y MANIFESTACIONES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	16
2.4 CICLO DE VIDA .....	17
2.5 DIAGNÓSTICO .....	18
2.6 CONTROL, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO.....	19
<b>3 -<i>T. cruzi</i> Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO. ....</b>	<b>20</b>
3.1 - VIA DE REPARACIÓN DEL DNA POR ESCISIÓN DE BASES .....	21
3.2- DAÑO OXIDATIVO AL DNA Y DNA GLICOSIDASAS.....	23
<b>4- HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>5- OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>25</b>
<b>6- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>25</b>
<b>7- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
7.1 – Amplificación de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 de <i>T. cruzi</i> . .....	26
7.1.1 - Cultivo de epimastigotes y obtención de DNA genómico de <i>T. cruzi</i> . ....	26
7.1.2 - Amplificación de las secuencias de TcNTH1 y TcOGG1.....	26

7.2 – Inserción de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 en vectores de clonamiento para bacterias y vectores de expresión para <i>T. cruzi</i> .	27
7.2.1 Clonamiento de amplificadas de las secuencias de TcNTH y TcOGG1 en el vector de clonamiento pGEM-T <i>easy</i> .	27
7.2.2 - Clonamiento de amplificadas de las secuencias de TcNTH1 y TcOGG1 en el vector de expresión pTREX-GFP específico para <i>T. cruzi</i> .	27
7.3 - Transfección y selección de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con los constructos pTREX-TcNTH1-GFP y pTREX-TcOGG1-GFP.	28
7.4 Evaluación de la viabilidad de los epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-TcNTH1-GFP y pTREX-TcOGG1-GFP sometidos a diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	29
7.5 Análisis estadísticos.	29
<b>8 – RESULTADOS</b>	<b>30</b>
8.1- Amplificación de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 de <i>T. cruzi</i> .	30
8.2 – Inserción de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 en vectores de clonamiento para bacterias y vectores de expresión para <i>T. cruzi</i> .	31
3- Evaluación de la viabilidad de los epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-GFP-TcNTH1 y pTREX-GFP-TcOGG1 sometidos a diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	33
<b>9- FIGURAS</b>	<b>34</b>
<b>10- DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
<b>11 - CONCLUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>12- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida para <i>T. cruzi</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Vía corta y larga de reparación del DNA por escisión de bases (BER).....	22
<b>Figura 3:</b> Alineamiento entre secuencias aminoacídicas entre hNTH1 y TcNTH1 .....	34
<b>Figura 4:</b> Alineamiento entre secuencias aminoacídicas entre hOGG1 y TcOGG1 .....	35
<b>Figura 5:</b> Modelamiento 3D de TcNTH1 (A) hNTH1 (B .....	36
<b>Figura 6:</b> Modelamiento 3D de TcOGG1 (A) y hOGG1 (B .....	37
<b>Figura 7:</b> Electroforesis al producto de PCR realizado con los partidores específicos de TcOGG1 y TcNTH1 a partir de DNA de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	38
<b>Figura 8:</b> Secuenciación automática del constructo amplificado pGEM-T easy-TcOGG1 .....	40
<b>Figura 9:</b> Secuenciación automática del constructo amplificado pGEM-T easy-TcNTH1, purificado desde bacterias <i>E. coli</i> B121 seleccionadas por PCR de colonias; <b>Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Figura 10:</b> Electroforesis del amplificado de TcOGG1 a partir de pGEM-T-Easy-TcOGG1. .... <b>Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Figura 11:</b> Electroforesis del amplificado de TcNTH1 a partir de pGEM-T-Easy-TcNTH1 .... <b>Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Figura 12:</b> Electroforesis del producto de PCR de colonias realizado luego de la electroporación con el constructor pTREX-GFP-TcOGG1 a bacterias <i>E. coli</i> B121; <b>Error! Marcador no definido.</b>	



**Figura 13:** Electroforesis del producto de PCR de colonias realizado luego de la electroporación con el constructo pTREX-GFP-TcNTH1 a bacterias *E. coli* cepa BI21. .... 41

**Figura 14:** Electroforesis del producto de PCR realizado al resultado de la extracción del plasmidio pTREX-GFP-TcOGG1 luego de ser amplificadas las colonias de bacterias *E. coli* BI21 2 y 7, positivas en el PCR de colonias ..... 44

**Figura 15:** Electroforesis del producto del corte de la enzima de restricción *XbaI* ..... 46

**Figura 16:** Electroforesis del producto de PCR realizado al resultado de la extracción del plásmido pTREX-GFP-TcNTH luego de ser amplificadas las colonias de bacterias BI21 1, 3 y 7, positivas en el PCR de colonias. .... **¡Error! Marcador no definido.**

**Figura 17:** Electroforesis del producto del corte de las enzimas de restricción *XbaI* y *HindIII* ..... **¡Error! Marcador no definido.**

**Figura 18:** Fotografías obtenidas por microscopia de fluorescencia..... 49

**Figura 19:** Western Blot realizado al lisado de epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-GFP-TcOGG1 (A), (B) pTREX-GFP-TcNTH1 ..... 50

**Figura 20:** Ensayo de viabilidad parasitaria ..... 51

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, a parasitic protozoan, is the etiological agent of Chagas' disease, an endemic pathology in Latin America. The transmission of the disease is produced by an infected triatomine insect that upon feeding on mammalian blood, deposits feces with infective parasites (trypomastigotes) which enter the mammalian body mainly through the skin wound produced by the insect. Upon entering the body, parasites invade macrophages taking a round, replicative form, the amastigote. After replication, amastigotes transform back to trypomastigotes that invade heart, ganglia and other tissues. Drugs used for treatment of Chagas disease are only active in acute infection and present collateral effects.

To establish a chronic infection some parasites must resist the oxidative damage to its DNA exerted by oxygen and nitrogen free radical (ROS/RNS) generated by the host cells. Survival may be achieved through parasite DNA repair, by the base excision repair pathway (BER). Initiation of BER occurs by recognition of a damaged DNA base by a DNA glycosylase, which catalyzes the hydrolysis of the N-glycosidic bond of the damaged deoxynucleotide, creating an AP site. We studied the effect of TcNTH1 and TcOGG1 DNA glycosilases overexpression in parasites exposed to oxidative stress.

Two lines of recombinants epimastigotes of *T. cruzi* TcNTH1 and TcOGG1 was created.

Contrarily to human orthologous, both DNA glycosylases were found mainly in the parasite nuclei. Epimastigotes submitted to hydrogen peroxide show no significant viability differences between the wild type and the transfected parasites.

Our results confirm the presence of a canonical BER pathway in *T. cruzi*. As previously observed in other eukaryote cells overexpression of DNA glycosylases do not increase cell viability when submitted to oxidative species. Future aims will be to purify and characterize both proteins.

## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi*, es un parásito protozoo, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, patología endémica en Latino América. La transmisión de esta enfermedad es producida por un insecto vector triatomino que, luego de alimentarse de la sangre de un mamífero, deposita sus deyecciones con las formas infectivas del parásito (tripomastigotes) las que ingresan al torrente sanguíneo a través de la lesión cutánea generada por el insecto. Una vez dentro, el parásito invade macrófagos y se divide al adoptar la forma amastigote. Luego de replicarse, los amastigotes retoman nuevamente la forma de tripomastigotes, se liberan del macrófago y por vía sanguínea o linfática invaden corazón, ganglios y otros tejidos. Las drogas usadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son efectivas durante la fase aguda de la infección; sin embargo, su efectividad es sólo parcial en la enfermedad crónica y generan diversos efectos secundarios.

Para establecer una infección crónica, algunos parásitos resisten el estrés oxidativo y reparan el daño al DNA, generado por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) producidas por las células del sistema inmune del hospedero. La sobrevivencia de los parásitos se relacionaría con la capacidad de reparación del DNA, donde la vía de reparación por escisión de bases (BER) juega un rol fundamental. En el inicio de esta vía participan DNA glicosidasas que reconocen bases nucleotídicas alteradas en el DNA, catalizando la hidrólisis del enlace N-glicosídico, originando un sitio abásico apurínico/apirimidínico. En esta memoria de título se determinó el efecto de la sobreexpresión de las DNA glicosidasas TcNTH1 and TcOGG1 en epimastigotes expuestos a estrés oxidativo.

Se crearon dos líneas de epimastigotes de *T. cruzi* recombinantes para las glicosilasas TcNTH1 y TcOGG1

A diferencia de lo descrito para enzimas ortólogas de humanos, ambas DNA glicosidasas fueron localizadas principalmente en el núcleo del parásito. Por otra parte, no se evidenciaron diferencias significativas en la viabilidad de epimastigotes transfectados y controles expuestos a peróxido de hidrógeno.

Nuestros resultados confirman la presencia de la vía BER en *T. cruzi*. Como ha sido observado en estudios realizados en células de otros organismos eucariontes, la sobreexpresión de

DNA glicosidasas no incrementa la viabilidad celular frente a agentes oxidantes. En un futuro cercano se espera purificar y caracterizar ambas DNA glicosidasas, así como estudiar la viabilidad de tripomastigotes transfectados.

## 1- INTRODUCCION

*Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo hemoflagelado, que presenta un ciclo de vida indirecto con tres formas celulares: epimastigote, forma extracelular replicativa y no infectiva, presente en el intestino medio de los vectores triatomínicos; tripomastigote, forma no replicativa e infectiva, que se encuentra tanto en el vector como en hospederos mamíferos y finalmente, la forma amastigote, intracelular replicativa, solo presente en hospederos mamíferos.

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* está sometido a la acción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), que pueden afectar su DNA en sus tres formas celulares. No obstante, el parásito sobrevive a la acción de estos agentes oxidantes. En eucariontes recientes, el principal mecanismo de reparación de daño oxidativo del DNA es la vía de escisión de bases (BER), donde las enzimas DNA Glicosidasas NTH1 y OGG1 son fundamentales en la detección y remoción de bases oxidadas.

El clonamiento y sobreexpresión de estas glicosidasas ha sido ampliamente estudiado en eucariontes. Indagaciones realizadas en células linfoblastoides TK6 señalan que la sobreexpresión de NTH1 o OGG1 incrementa su sobrevivencia frente a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En células SH-SY5Y de neuroblastoma humano tratadas con ROS, la sobreexpresión de OGG1 determina una reducción en el nivel de daño al DNA nuclear, sin un incremento de la sobrevivencia celular. Estos resultados sugieren que la participación de las DNA glicosidasas en la sobrevivencia celular, luego de exposición a agentes que dañan el DNA, puede variar dependiendo del tipo de célula y del agente genotóxico utilizado.

En *T. cruzi* no hay estudios disponibles relacionados a ambas DNA glicosidasas. Mediante el uso del software “Clustal-W2” y “BLAST” y utilizando la base de datos del *U.S National Library of Medicine, National Institutes of Health PubMed*, se identificaron las secuencias génicas y aminoacídicas hipotéticas para TcNTH1 y TcOGG1 de *T. cruzi*, ortólogas de NTH1 y OGG1 humanas.

Con los antecedentes señalados, en esta Memoria de Título se propone que: “La sobreexpresión de las proteínas TcNTH1 y TcOGG1 en epimastigotes de *T. cruzi* incrementa la sobrevivencia frente a exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”. Los resultados de esta Memoria proporcionarán

información sobre nuevas enzimas que podrían considerarse como posibles blancos para la inhibición de la reparación del DNA dañado en este parásito.

## 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGÍA

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, descrita por primera vez en 1909 por Carlos Ribeiro Justino Chagas, es una parasitosis endémica en América Latina. Se estima que aproximadamente 10 a 15 millones de individuos están infectados y cerca de 75 a 90 millones están en riesgo de contraer la infección (Coura, 2007; Yun *et al.*, 2009). Es la cuarta causa de muerte por parasitosis en Latinoamérica donde cada año se reportan alrededor de 41.000 casos nuevos y 43.000 defunciones asociadas a la patología (WHO, 2007; Dias, 2007; Abramson *et al.*, 2005).

La enfermedad de Chagas presenta una amplia distribución geográfica, extendiéndose desde el sur de los E.E.U.U. al sur de Argentina y Chile. Sin embargo, ha sido descrita en Canadá, Europa, Japón y otras regiones no endémicas debido fundamentalmente a migraciones de individuos infectados (Tanowitz *et al.*, 2011; Prata, 2001)

En Chile, el área endémica de la enfermedad abarca desde la Región de Arica-Parinacota hasta la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana. Se estima que la población expuesta es de aproximadamente 850.000 personas con alrededor de 120.000 habitantes infectados, principalmente en la región de Coquimbo donde se reportó el 56% de los casos a nivel nacional (Minsal, 2012; Apt *et al.*, 2008).

La transmisión del parásito es principalmente a través de insectos vectores hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (Teixeira *et al.*, 2008). En Chile, se ha descrito la existencia de dos vectores triatominos involucrados en la transmisión de *T. cruzi*: *Triatoma infestans*, que presenta un ciclo de vida peri domiciliario y *Mepraia spinolai*, de ciclo de vida silvestre. Además, se ha descrito la presencia de dos especies más de triatominos en el país, también de ciclo de vida silvestre: *Mepraia gajardoi*, que habita las playas y desiertos costeros de la primera y segunda región (Carvajal *et al.*, 2007) y *Mepraia parapatrica*, que se encuentra en el norte de Chile (Minsal, 2012).

Desde el año 1991 en Chile se encuentra en ejecución del Programa Nacional de Control del Vector abocado a la eliminación domiciliar de *T. infestans*. Sin embargo, se ha observado que a medida que disminuye la población de vectores domésticos, los vectores silvestres cobran mayor importancia epidemiológica. En relación a esto, investigaciones realizadas en *M. gajardoi*, indican la presencia de *T. cruzi* en el 19,2% de los ejemplares capturados en el litoral de la ciudad de Arica, similar a lo observado anteriormente para *M. spinolai* (Carvajal *et al.*, 2007).

## 2.2 ETIOLOGÍA

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el protozoo hemoflagelado *T. cruzi*, perteneciente al orden *Kinetoplastidae*, familia *Trypanosomatidae*. Este orden es uno de los más antiguos en la evolución de eucariontes, estimándose su aparición en el planeta hace 2000 millones de años (Cavalier-Smith, 1993). Otras especies pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* también se han relacionado a patologías de gran importancia para la medicina humana y animal como la Enfermedad del sueño o Tripanosomiasis Africana producida por *Trypanosoma brucei* y la Leishmaniasis (De Souza, 2002).

En una primera instancia *T. cruzi* se clasificó en dos grandes grupos o linajes: Linaje I o TCI que participa en el ciclo de vida silvestre del parásito, afectando a mamíferos pequeños y marsupiales de vida libre, y Linaje II o TCII que a su vez tiene cinco subgrupos ordenados de la “a” a la letra “e”. Este último linaje desarrolla un ciclo de vida doméstico, siendo el principal agente causal de la enfermedad de Chagas en humanos (Rozas *et al.*, 2008). Los linajes TcI y TcIIb serían los más antiguos. Los linajes TcIIa, TcIIc, TcII d y TcIIe tendrían su origen en hibridaciones generadas a lo largo de la evolución del parásito (Teixeira *et al.*, 2006). Actualmente, por consenso del segundo simposio satélite de nomenclatura de *T. cruzi* realizado en agosto de 2009 en Buzios, Brasil se definió la siguiente clasificación: TcI (antes TcI), TcII (antes TcIIb), TcIII (antes TcIIc), TcIV (antes TcIIa), TcV (antes TcII d), TcVI (antes TcIIe) (Zingales *et al.*, 2009). No se ha establecido una correlación definitiva entre la severidad de la enfermedad y el linaje del parásito, pero si una correlación entre las manifestaciones clínicas y la zona geográfica donde fueron infectados los pacientes (Rassi *et al.*, 2010).

## 2.3 SIGNOS CLÍNICOS Y MANIFESTACIONES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas cursa en 3 fases progresivas: fase aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda generalmente es asintomática o con síntomas variable, como fiebre, dolor de cabeza, anorexia, malestar, mialgia, debilidad, náuseas, vómitos y diarrea (Prata, 2001). Puede afectar individuos de cualquier edad, sin embargo la mayoría de los casos se diagnostican en personas de hasta 15 años, con una mayor frecuencia entre los 1 a 5 años de edad. Un 3% de los pacientes que cursan esta fase presentan una reacción inflamatoria local característica conocida como chagoma de inoculación. Si el ingreso del parásito ocurre a través de la conjuntiva ocular puede presentarse un edema bpalpebral unilateral indoloro característico conocido como “signo de Romaña” (Bern, 2011; Rassi *et al.*, 2010). Por otra parte, en casos extremos los sujetos infectados pueden cursar una miocarditis aguda que generalmente conduce a la muerte (WHO, 2002). El periodo de incubación, luego de la inoculación de *T. cruzi*, es de 1 a 2 semanas, siendo posible la detección de parásitos en la sangre. Luego de 4 a 8 semanas, la replicación parasitaria es controlada por el sistema inmune del hospedero, disminuyendo la parasitemia a niveles indetectables por microscopía (Bern, 2011).

En la fase indeterminada de la enfermedad no se evidencian síntomas y puede tener una duración variable de meses a años. Un 30-40% de los pacientes que cursan esta fase progresan hacia la fase crónica, la cual se manifiesta generalmente con fallas multiorgánicas que por lo habitual incluyen alteraciones cardíacas y digestivas (Prata, 2001).

Las manifestaciones clínicas más características de la fase crónica de la enfermedad de Chagas son la cardiomiopatía, falla cardíaca, arritmias y tromboembolismo. La cardiomiopatía chagásica es la consecuencia clínica más importante de la infección con *T. cruzi*, manifestándose generalmente 10 a 20 años luego de la fase aguda. Por otra parte, algunos pacientes chagásicos crónicos pueden desarrollar la forma digestiva de la patología, ocasionada por la destrucción de la inervación autonómica entérica. Las anomalías más frecuentes en este tipo de cuadros son megaesófago y megacolon (WHO, 2002).

Se ha observado que pacientes inmunodeprimidos (como individuos VIH positivo) desarrollan una de las formas más severas de la enfermedad, presentando signos neurológicos,

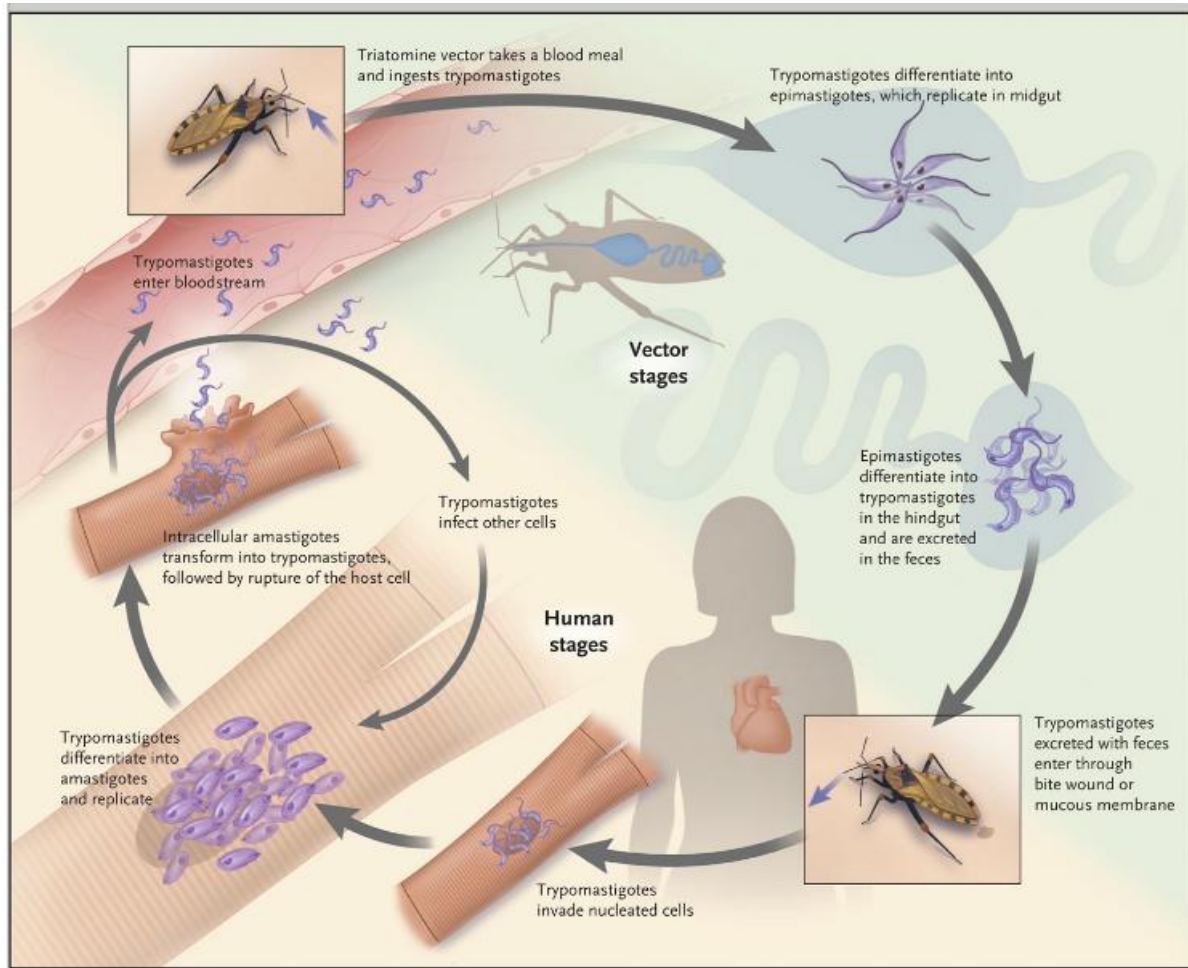


cardiacos y en algunos casos, abscesos cerebrales. En este tipo de pacientes existe riesgo de reagudización de la enfermedad debido a la reactivación de la replicación de amastigotes persistentes en algunos tejidos (Rassi *et al.*, 2010).

## 2.4 CICLO DE VIDA

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida indirecto (Figura 1), requiriendo la participación de un insecto hematófago triatomino y un hospedero mamífero, incluyendo al hombre. El ciclo de vida domiciliario se presenta preferentemente en áreas rurales y se inicia cuando el hospedero triatomino infectado se alimenta de la sangre de un mamífero. Concomitantemente deposita sus deyecciones conteniendo la forma celular tripomastigote metacíclico de *T. cruzi* (forma no replicativa e infectiva). Estos penetran al mamífero por el sitio de la picadura, facilitado por el rascado del paciente y las enzimas proteolíticas contenidas en la saliva del insecto hematófago. En el mamífero, los tripomastigotes colonizan primariamente macrófagos y otros leucocitos. Durante la invasión a la célula hospedera, el tripomastigote es incorporado en una vesícula parasitófora, de la cual escapa al citoplasma donde se diferencia a amastigote (forma replicativa, intracelular). Luego de una serie de divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que, mediante citólisis son liberados nuevamente a la sangre infectando diversos tejidos como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y células de la glía del sistema nervioso central (Andrade y Andrews, 2005). Cuando un triatomino se alimenta de un mamífero infectado adquiere las formas tripomastigotas que en el intestino medio del insecto hematófago se diferencian a epimastigotes (forma extracelular, replicativa, no infectiva). Finalmente, los epimastigotes, al alcanzar el tracto digestivo posterior del triatomino, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, cerrando el ciclo de vida de *T. cruzi* (Bern, 2011; Tyler y Engman, 2001).

Además de la transmisión vectorial, existen otros mecanismos de transmisión del parásito como las transfusiones sanguíneas, la vía transplacentaria, el trasplante de órganos, la vía oral y los accidentes de laboratorio (Tyler y Engman, 2001).



**Figura 1: Ciclo de vida para *T. cruzi* (Bern, 2011).**

## 2.5 DIAGNÓSTICO

La elección del método de diagnóstico para la enfermedad de Chagas se determina normalmente según la fase en que se encuentre el paciente. En individuos que cursan la fase aguda el método de elección es la observación microscópica directa de tripomastigotes en sangre no-coagulada o bien, detección del parásito en frotis sanguíneo teñido con Giemsa. Además, es posible diagnosticar la enfermedad por detección indirecta de parásitos mediante xenodiagnóstico. Para tales efectos, insectos triatominos libres de patógenos (criados en el laboratorio) se alimentan de la sangre del individuo a diagnosticar, analizándose posteriormente, el tracto intestinal del vector en busca de formas parasitarias (Rassi *et al.*, 2010).

El diagnóstico de individuos que cursan la fase crónica se basa en la detección de Inmunoglobulinas G específicas anti *T. cruzi* (WHO, 2007). Las pruebas más empleadas son 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 a un paciente. También es posible detectar el DNA parasitario en la sangre del paciente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rassi *et al.*, 2010).

## **2.6 CONTROL Y PREVENCIÓN**

La erradicación de la enfermedad de Chagas resulta prácticamente imposible, pues es una zoonosis que cuenta con una gran cantidad y diversidad de insectos vectores así como de hospederos mamíferos. La ausencia de drogas que reduzcan incluso parcialmente las posibilidades de transmisión y la ausencia de una vacuna, hacen que el único método efectivo sea el control de los vectores mediante el uso de insecticidas. Los programas de prevención de la transmisión se basan en la fumigación de viviendas con insecticidas de efecto residual y en la vigilancia continua de su re-infestación. Los piretroides sintéticos son de elección por tener baja toxicidad en humanos y una alta capacidad triatomicida, además de una acción repelente. A esto debe sumarse el mejoramiento de las condiciones de viviendas para hacer más difícil la colonización de vectores intradomiciliarios, disminuyendo las posibilidades de interacción entre humanos y triatominos (WHO, 2007).

### **2.6b TRATAMIENTO**

Actualmente existen dos medicamentos utilizados contra *T. cruzi*, Nifurtimox y Benznidazol. Sin embargo, la baja eficacia de éstos para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad y los diversos efectos colaterales indeseados que generan, evidencian la necesidad de desarrollar nuevas drogas más eficientes en la eliminación del parásito y más inocuas para el paciente (Urbina y Docampo, 2003).

Benznidazole es usualmente mejor tolerado y es considerado por muchos expertos como el tratamiento de primera línea, no obstante algunos pacientes toleran mejor nifurtimox. Ambas drogas están contraindicadas durante la gestación, así como en individuos con fallas hepáticas o renales (Rassi *et al.*, 2010). Pacientes con cardiomiopatía avanzada, especialmente aquellos con falla cardíaca congestiva pobremente compensada, no son candidatos para el tratamiento, pues este no soluciona las alteraciones cardíacas estructurales, y más aun las drogas generalmente son muy mal toleradas (Bern, 2011).

El estudio y desarrollo de nuevos fármacos que tengan la capacidad de ser utilizados en terapias más cortas y con menos efectos colaterales aún se encuentra en desarrollo. Sin embargo, esta área de investigación es costosa y poco rentable por ser una enfermedad asociada al subdesarrollo. A consecuencia de esto las empresas farmacéuticas se han enfocado en la investigación de enfermedades que generen mayor retribución de acuerdo a su inversión (WHO, 2007).

### **3 - *T. cruzi* Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO.**

En mamíferos, la resistencia a *T. cruzi* es dependiente de la activación de células del sistema inmune innato. En respuesta a patógenos, tanto macrófagos como neutrófilos pueden producir gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), que incluyen  $O_2^{\cdot-}$  y óxido nítrico ( $NO\cdot$ ).  $O_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con  $NO\cdot$  y producir peroxinitrito ( $NOO\cdot^-$ ), agente generado comúnmente por macrófagos como primera línea de defensa durante la fagocitosis (Hogg *et al.*, 1992). Además,  $O_2^{\cdot-}$  es un precursor de  $H_2O_2$  que a su vez, en presencia de hierro (II) y cobre (I), es responsable de la formación de  $OH\cdot^-$  (Halliwell y Gutteridge, 1984). Por tales motivos, los parásitos protozoarios han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antiparasitaria (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

Las tres formas de *T. cruzi* se encuentran expuestas a ROS/RNS. Así, dentro del intestino de los vectores artrópodos, los epimastigotes se enfrentan a moléculas resultantes de la degradación del grupo hemo. El catabolismo del grupo hem puede generar ROS debido a la liberación de ión ferroso que, mediante la reacción de *Fenton* (en presencia de  $H_2O_2$ ) genera altas concentraciones de radicales  $OH\cdot^-$  (Paes *et al.*, 2011; Graça-Souza *et al.*, 2006).

Por otra parte, en el inicio de la infección parasitaria los tripomastigotes infectan macrófagos, incorporándose en una vesícula parasitófora en la cual se ensamblan las diferentes subunidades del complejo NADPH oxidasa. Este complejo es capaz de producir altas concentraciones de  $O_2^{\cdot-}$  (Piacenza *et al.*, 2009). Aniones superóxidos pueden generar  $H_2O_2$  por dismutación espontánea o catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Paes *et al.*, 2011). Por otra parte, en el hospedero mamífero los tripomastigotes son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR2 y TLR9) presentes en células dendríticas y macrófagos. La activación de estos receptores induce la expresión de IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Sibley, 2011) que favorece la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos con la consecuente generación de NO. Esta molécula difunde desde el citoplasma hacia el interior de la vesícula parasitófora reaccionando con  $O_2^{\cdot-}$  llevando a la formación de  $NOO^{\cdot-}$  (Aliberti *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2000; Piacenza *et al.*, 2009). No obstante, la infección puede ser controlada, pero no eliminada por el sistema inmune, estableciéndose las fases indeterminada y crónica de la enfermedad de Chagas (Piacenza *et al.*, 2009).

Finalmente, estudios recientes indican que cardiomiocitos infectados crónicamente con *T. cruzi* presentan un estado de estrés oxidativo persistente (que afectaría a amastigotes) atribuible a dos procesos: un importante grado de infiltrado inflamatorio en el miocardio y una disfunción mitocondrial que afecta a los cardiomiocitos parasitados (Zacks *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2009).

### **3.1 - VIA DE REPARACIÓN DEL DNA POR ESCISIÓN DE BASES**

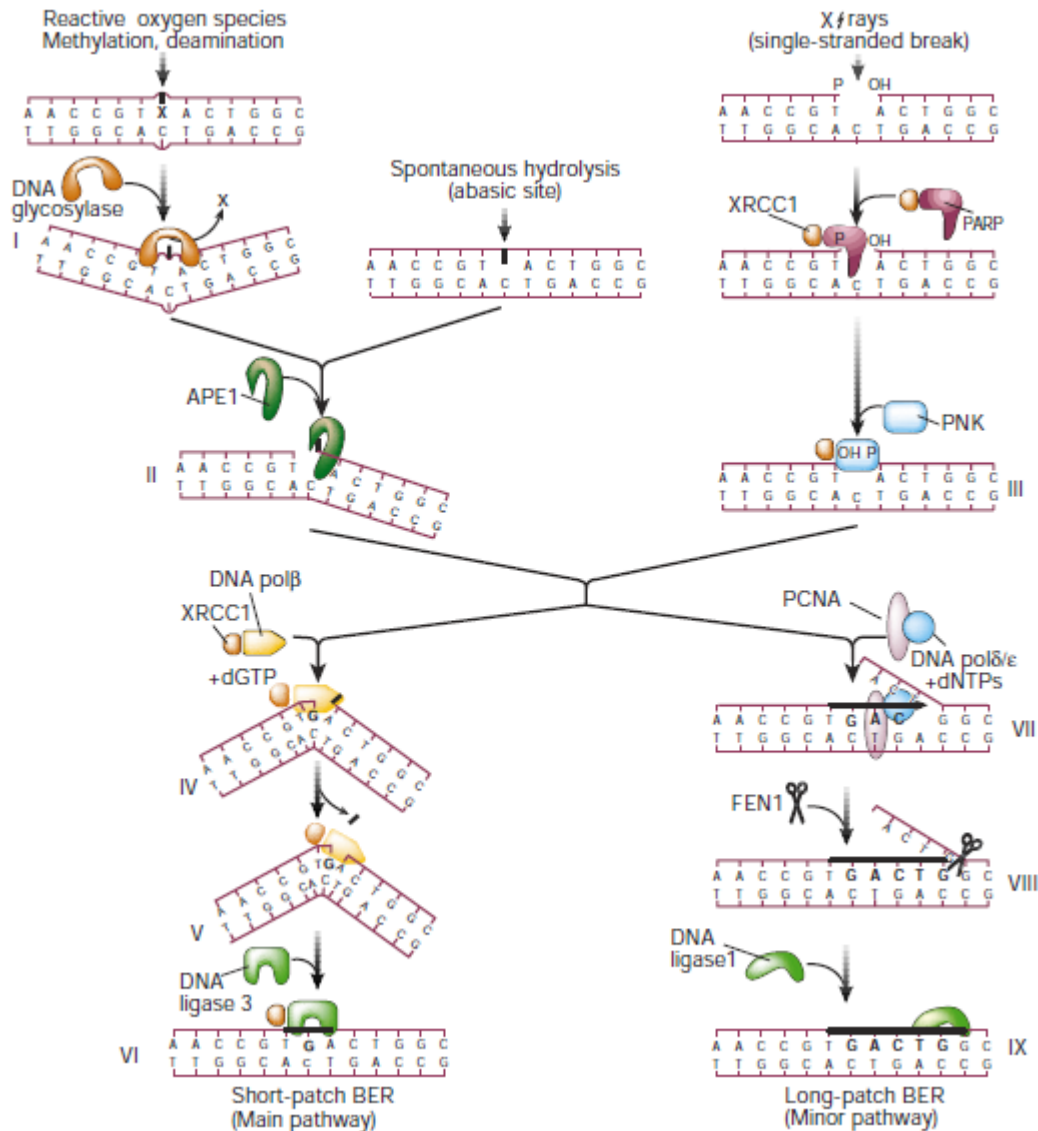
En la literatura se ha descrito recientemente que los agentes oxidantes son capaces de originar daño del DNA nuclear y del kinetoplasto de *T. cruzi* (Cabrera *et al.*, 2011). En organismos eucariontes, la vía de reparación por escisión de bases (BER) es uno de los principales mecanismos de reparación de daño oxidativo del DNA (Figura 2). En mamíferos, se han descrito dos sub-vías de BER: la vía corta, que repara solo el nucleótido dañado y la vía larga de BER, que repara el nucleótido dañado más fragmentos de uno o más nucleótidos aledaños (Kumar *et al.*, 2011). Ambas vías comparten un inicio común, donde una DNA glicosidasa específica como OGG1 o NTH1 detecta la base dañada y la elimina mediante el corte del enlace N-glicosídico que une la base y la pentosa, generando un sitio apurínico/apirimidínico (AP) o

sitio abásico. El residuo azúcar/fosfato remanente es reconocido por una endonucleasaapurínico/apirimidínica (endonucleasa AP) que corta el enlace 5' fosfodiester del sitio AP, generando un extremo 3' OH libre. Este último sirve de sustrato para una DNA polimerasa  $\beta$  que incorporará el nucleótido correspondiente mediante complementariedad de bases (Robertson *et al.*, 2009). La DNA polimerasa  $\beta$  además presenta actividad AP liasa o deoxiribosa fosfodiesterasa que permite la eliminación del remanente de azúcar/fosfato mediante corte del enlace 3' fosfodiester, proceso denominado  $\beta$ -eliminación. Esta actividad AP liasa es realizada muchas veces por algunas DNA glicosidasas bifuncionales (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 DNA polimerasas  $\beta$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$  que se asocian al antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) agregando más de un nucleótido en la reparación. Paralelamente, se genera un remanente de nucleótidos, conocido como alerón o flap, a medida que la DNA polimerasa agrega nuevos nucleótidos. Esta cadena es reconocida por una *Flap* endonucleasa 1 (FEN1), que realiza la  $\beta$ -eliminación, permitiendo de esta manera que una DNA ligasa termine la reparación del DNA (Robertson *et al.*, 2009). No se conocen los mecanismos moleculares relacionados a la elección de una u otra sub-vía.

Hasta la fecha, se ha descrito la presencia y actividad de algunas proteínas involucradas en la vía BER en *T. cruzi*, por ejemplo Uracil DNA glicosidasa (UDGasa) (Fárez-Vidal *et al.*, 2001). También, se ha señalado la presencia del gen APE1 (TcAP1) en este parásito (Pérez *et al.*, 1999). Además, se ha mostrado que metoxiamina, compuesto que inhibe irreversiblemente la vía BER, se relaciona a una disminución de la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes expuestos a ROS/RNS. Estos resultados sugieren que en ambas formas celulares existe actividad relacionada con la vía BER para la reparación del DNA (Cabrera *et al.*, 2011).

De las enzimas que participan de la vía BER, las DNA glicosidasas son cruciales pues: a) son las enzimas iniciales de la vía, encargadas de reconocer las bases nucleotídicas dañadas (Zarkov, 2008); b) se ha propuesto que probablemente el tipo de DNA glicosidasa se relacione en la elección de la su-vía corta o larga de BER (Fortini *et al.*, 1999).



**Figura 2.- Vía corta y larga de reparación del DNA por escisión de bases (BER).**  
(Hoeijmakers, 2001)

### 3.2- DAÑO OXIDATIVO AL DNA Y DNA GLICOSIDASAS

Como se mencionó previamente, las DNA glicosidasas involucradas en la vía BER se clasifican como mono funcionales (aquellas que solo eliminan la base modificada), o bifuncionales (aquellas que también poseen actividad AP liasa). Indagaciones efectuadas en células humanas señalan que las bases oxidadas son reconocidas y eliminadas por DNA

glicosidasas de la familia *Nei-like* (NEIL1 y NEIL2) y DNA glicosidasas de la familia NTH, fundamentalmente OGG1 y NTH1 (Zarkov, 2008). NTH1 es específica para la remoción de bases pirimídicas oxidadas como 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol), 5-hidroxicitosina y dihidrouracilo. A su vez, OGG1 es responsable de la reparación de productos de oxidación de guaninas como 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG). En el genoma de *T. cruzi* se identificaron las secuencias de los genes que codifican para las proteínas TcNTH1 y TcOGG1, ortólogas de hNTH1 y hOGG1 de humano, respectivamente. Sin embargo, no se identificaron secuencias ortólogas para DNA glicosidasas de la familia *Nei-like*.

Estudios realizados por Lu *et al.* (2004) demostraron que la sobreexpresión de OGG1 en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano reduce el nivel de daño al DNA nuclear, pero no incrementa la sobrevivencia celular luego de tratamientos con ROS. En contraste, la sobreexpresión de OGG1 o NTH1 en células linfoblastoides TK6 disminuye la viabilidad celular luego de tratamientos con radiación gamma, pero incrementa significativamente la sobrevivencia frente a la exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yang *et al.*, 2006). De manera similar, la sobreexpresión de OGG1 en mitocondrias de fibroblastos de ratón incrementa la viabilidad celular luego de exposición a ROS (Rachek *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la participación de las DNA glicosidasas en la sobrevivencia celular, luego de exposición a agentes que dañan el DNA, puede variar dependiendo del tipo de célula y del agente genotóxico utilizado. En *T. cruzi* no hay datos disponibles en relación a las consecuencias de la sobreexpresión estas enzimas. Esta memoria de título propone estudiar la sobreexpresión de las proteínas TcNTH1 y TcOGG1 en epimastigotes de *T. cruzi* y su efecto en la sobrevivencia frente al estrés oxidativo. Estos resultados proporcionarían información sobre nuevas enzimas que pueden considerarse como posibles blancos para la inhibición de la reparación del DNA dañado en este parásito.



#### **4- HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de las proteínas TcNTH1 y TcOGG1 en epimastigotes de *T. cruzi* incrementa la sobrevivencia frente a exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **5- OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación de las proteínas TcNTH1 y TcOGG1 de *T. cruzi* en la resistencia a especies reactivas del oxígeno.

#### **6- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**6.1** - Detectar y aislar las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 de *T. cruzi*.

**6.2** - Generar vectores de clonamiento para bacterias y vectores de expresión para *T. cruzi* con las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1.

**6.3** - Generar líneas de epimastigotes de *T. cruzi* recombinantes para los genes TcNTH1 y TcOGG1.

**6.4** - Evaluar la viabilidad de los epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-GFP-TcNTH1 y pTREX-GFP-TcOGG1 sometidos a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 7- MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 – Amplificación de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 de *T.*

#### *cruzi.*

#### **7.1.1 - Cultivo de epimastigotes y obtención de DNA genómico de *T. cruzi.***

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

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

#### **7.1.2 - Amplificación de las secuencias de TcNTH1 y TcOGG1.**

Para la obtención de los amplificadores de secuencias de DNA codificantes para la proteína TcNTH1 (756 pb) y TcOGG1 (1461 pb) se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando DNA total de *T. cruzi* como DNA molde. Los partidores específicos de ambos genes se elaboraron a partir de secuencias obtenidas en bases de datos de internet NCBI GenBank (AB001575.1) para TcNTH1, y GenBank (NM\_002542.5) para TcOGG1, agregando fragmentos nucleotídicos con sitios de corte para enzimas de restricción *Xba* I (en rojo) o *Hind* III (en azul). Los ciclos termales utilizados fueron: 5 minutos de denaturación a 95°C, seguidos de 20 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 63°C y 90 seg a 72°C. Posteriormente, se aplicaron 20 ciclos de 30 seg a 95°C y 90 seg a 72°C. La extensión final fue de 5 min a 72°C. La visualización de los fragmentos génicos amplificados se realizó en geles de agarosa 1% p/v en tampón TBE pH 8,0, teñidos con bromuro de etidio.

#### **Partidores para la secuencia codificante de TcNTH1:**

Sentido: GCTCTAGAATGAAGAAGCATGCGTTCAAGC (*Xba* I)

Antisentido: CCCAAGCTTCCGGGTATCGACATCTTCGAT (*Hind* III)

#### **Partidores para la secuencia codificante de TcOGG1**

Sentido: GCTCTAGAATGTATTTTGGCTATGCAATGGAGT (*Xba* I)

Antisentido: GCTCTAGAGTTGTCTCTTTGCCCTCTTCG (*Xba* I)

## **7.2 – Inserterción de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 en vectores de clonamiento para bacterias y vectores de expresión para *T. cruzi*.**

### **7.2.1 Clonamiento de amplificadores de las secuencias de TcNTH y TcOGG1 en el vector de clonamiento pGEM-T *easy*.**

Los amplificadores de DNA codificantes para las proteínas TcNTH1 y TcOGG1 fueron purificados con el *kit SV Gel and PCR Clean-Up System*<sup>®</sup> (Promega, Chile) e insertados en el vector de clonamiento pGEM-T *easy* (Promega, Chile), según protocolos del fabricante. Los constructos obtenidos se usaron para electroporar bacterias *E. coli* cepa JM109, las que se cultivaron en placas Petri con medio LB agar-ampicilina, añadiendo el inductor isopropil-1-tio-b-D-galactopiranosido (IPTG) y el cromógeno acoplado a galactosa X-Gal. La selección de clones positivos se realizó mediante colorimetría y la técnica de PCR de colonias. Los constructos obtenidos fueron finalmente sometidos a secuenciación automática de DNA.

### **7.2.2 - Clonamiento de amplificadores de las secuencias de TcNTH1 y TcOGG1 en el vector de expresión pTREX-GFP específico para *T. cruzi*.**

Se utilizó el vector de expresión pTREX-GFP de *T. cruzi*, el cual genera una proteína de fusión con la proteína fluorescente verde (GFP). Mediante PCR se amplificó la secuencia codificante para TcNTH1 y TcOGG1 utilizando los partidores descritos previamente y DNA molde de los constructos obtenidos en 6.1.1. Se utilizaron partidores que incluyen fragmentos nucleotídicos con sitios de corte para enzimas de restricción *Hind* III y *Xba* I para TcNTH1 y *Xba* I para TcOGG1. La visualización de los fragmentos génicos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1% p/v en tampón Tris-acetato-EDTA (TBE) pH 8,0, teñidos con bromuro de etidio. Los amplificadores fueron purificados con el *kit SV Gel and PCR Clean-Up System*<sup>®</sup> (Promega, Chile) y cortados con las enzimas de restricción mencionadas durante 18 horas a 37°C. Los fragmentos obtenidos fueron ligados en el vector pTREX-GFP, previamente cortado con las mismas enzimas de restricción. Los constructos obtenidos fueron utilizados para electroporar bacterias *E. coli* cepa BL21, las que se cultivaron en placas de Petri con medio LB agar-

ampicilina. La selección de clones positivos se realizó mediante la técnica de PCR de colonias y digestión con las enzimas de restricción correspondientes para la observación de la liberación de los fragmentos de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 en geles de agarosa. Los constructos pTREX-TcNTH1-GFP y pTREX-TcOGG1-GFP generados fueron purificados desde cultivos de bacterias transformadas utilizando el kit *QIAprep Spin Miniprep*<sup>®</sup> (QIAGEN, Chile), según instrucciones del fabricante. Ambos constructos fueron sometidos a secuenciación automática de DNA para evaluar el correcto marco de lectura.

### **7.3 - Transfección y selección de epimastigotes de *T. cruzi* con los constructos pTREX-TcNTH1-GFP y pTREX-TcOGG1-GFP.**

Epimastigotes de la clon Dm28c se transfectaron con los plasmidios pTREX-TcNTH1-GFP y pTREX-TcOGG1-GFP, generados en 6.2.2. Para tales propósitos, los parásitos se contaron en cámara de Neubauer y lavaron una vez en Buffer fosfato salino (PBS) estéril. Los parásitos se resuspendieron en medio de electroporación (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) a una concentración de 1x10<sup>8</sup> parásitos/ml. Posteriormente, 400 µl de epimastigotes resuspendidos se incubaron con 50-100 µg de cada plasmidio y electroporados a 0.3kV y 500µF en dos pulsos, separados por un intervalo de 10 seg. Inmediatamente, los parásitos se transfirieron a medio *Diamond* suplementado con 20% suero fetal bovino (SFB) e incubados durante 48 hrs a 28°C. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo se cambió por medio fresco conteniendo 250 µg/ml del antibiótico G418, con el objetivo de seleccionar los parásitos que insertaron el vector en su genoma. Esta concentración de antibiótico se mantuvo hasta la segunda semana y luego se aumentó a 400 µg/ml.

La comprobación de la expresión de cada proteína se realizó mediante visualización directa mediante microscopía de fluorescencia y ensayos de *western blot* (Ma y Shieh, 2006) en homogeneizados de proteínas totales de los parásitos, utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP de ratón y anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia.

#### **7.4 Evaluación de la viabilidad de los epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-TcNTH1-GFP y pTREX-TcOGG1-GFP sometidos a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de TcNTH1 y TcOGG1 en epimastigotes de *T. cruzi*, 12 millones de parásitos/ml fueron tratados con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 200, 500 y 1000 µM) durante 30 min a 28°C. Posteriormente, se incubaron en medio fresco durante 4 horas para permitir su recuperación (reparación del DNA). El efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular se evaluó mediante la reducción mitocondrial de sales de tetrazolium o MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a formazán, que tiene un color púrpura y cuya absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el medio. La intensidad del color se midió a 570 nm en un lector de microplacas (Cabrera *et al.*, 2011).

#### **7.5 Análisis estadísticos.**

Los resultados obtenidos en cada experimento se analizaron estadísticamente con el software *GraphPad Prism* versión 5.0. En todos los casos los resultados representan el promedio de 3 experimentos ± el error estándar de la media. Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) para comparar múltiples tratamientos y luego se realizó un análisis con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones, a fin de determinar los tratamientos que presenten diferencias significativas.

## 8 – RESULTADOS

En primer lugar, se realizó un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas descritas para hNTH1 (*GenBank accession* Y09687.1) y hOGG1 (*GenBank accession* NM\_016821) de *Homo sapiens* y las secuencias aminoacídicas putativas de TcNTH1 (*GenBank accession* XM\_803270.1) y TcOGG1 (*GenBank accession* XM\_816703) determinándose una identidad de 35,49% y 20,29 % respectivamente (Figuras 3 y 4). Además, aplicando esta metodología, se pudo establecer que los residuos aminoacídicos lisina 249 y ácido aspártico 268 participantes del sitio catalítico de hOGG1, están conservados en TcOGG1.

Paralelamente, utilizando el *software* Phyre versión 0.2 (*Imperial College of Science Technology and Medicine*), se realizó modelamientos 3D para TcNTH y TcOGG1 basados en la cristalografía de las glicosidasas hNTH1 y hOGG1 de origen humano, mostrando concordancia estructural a la superposición de imágenes (figura 5 y 6).

### 8.1- Amplificación de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 de *T. cruzi*.

En base a los antecedentes obtenidos del análisis de bases de datos, se procedió a amplificar la secuencia nucleotídica codificante para TcNTH1 y TcOGG1 mediante la técnica de PCR con partidores específicos, utilizando como molde DNA total aislado desde epimastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28 mantenidos en cultivo. En la figura 7 se muestra el resultado de la amplificación en un gel de agarosa 1% p/v en TBE 1x pH 8,0, teñido con bromuro de etidio. La presencia de amplificados de 756 pb (carril 3) y de 1492 pb (carril 5) concuerda con el tamaño esperado para las secuencias de TcNTH1 y TcOGG1, respectivamente. El carril 1 corresponde al marcador de pares de bases. Los carriles 2 y 4 corresponden a los controles negativos de la técnica de PCR sin DNA molde.

## **8.2 – Inserción de las secuencias de DNA codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 en vectores de clonamiento para bacterias y vectores de expresión para *T. cruzi*.**

Los fragmentos amplificados por PCR de los genes codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 fueron purificados desde geles de agarosa y clonados en el vector pGEM-T-*Easy*. Los constructos generados se utilizaron para electroporar bacterias electrocompetentes *E. coli* BL21. La selección de clones positivos se realizó mediante colorimetría y la técnica de PCR de colonias (resultados no mostrados). Los constructos pGEM-T-*Easy*-TcNTH1 y pGEM-T-*Easy*-TcOGG1 generados fueron finalmente sometidos a secuenciación automática de DNA, obteniéndose las secuencias nucleotídicas codificantes para ambas DNA glicosidasas (figuras 8 y 9).

Utilizando oligonucleótidos partidores con sitios para enzimas de restricción específicas y los constructos pGEM-T-*Easy*-TcNTH1 y pGEM-T-*Easy*-TcOGG1 como DNA molde, se amplificaron las secuencias nucleotídicas codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 mediante la técnica de PCR. Ambos amplificados fueron purificados desde geles de agarosa e incubados con las enzimas *Xba* I y *Hind* III (TcNTH1) o sólo *Xba* I (TcOGG1) para su posterior inserción en el vector de expresión pTREX-GFP de *T. cruzi*.

El producto de la ligación entre el vector pTREX-GFP y las secuencias nucleotídicas purificadas de TcNTH1 y TcOGG1 fue electroporado en bacterias *E. coli* BL21 que posteriormente fueron sembradas en placas de LB-agar con ampicilina. La selección de clones positivos se realizó mediante la técnica de PCR de colonias, obteniéndose 7 clones positivos para pTREX-GFP-TcNTH1 (figura 10) y para pTREX-GFP-TcOGG1 (figura 11).

Se seleccionaron 3 clones para pTREX-GFP-TcNTH1 (clones 1, 3 y 7) y 2 clones para pTREX-GFP-TcOGG1 (clones 2 y 7) de acuerdo a la intensidad y posición de las bandas obtenidas en la electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR que se obtuvo en el proceso anterior.

Los constructos fueron purificados desde las bacterias con el objetivo de evaluar nuevamente la presencia de los insertos en el vector. Esto último fue corroborado mediante amplificación por PCR, utilizando los partidores diseñados para cada DNA glicosidasa y visualización en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Para todos los clones analizados

fue posible observar la presencia de amplificadores para TcNTH1 (figura 12, carriles 4, 5 y 6) y TcOGG1 (figura 13, carriles 4 y 5). Además, se realizaron ensayos de digestión durante 5 horas a 37°C con las enzimas *Xba* I y *Hind* III para el constructo pTREX-GFP-TcNTH1 clon 1, y *Xba* I para el constructo pTREX-GFP-TcOGG1 clon 2. Ambas digestiones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, con el propósito de observar la liberación de los fragmentos del tamaño esperado para TcNTH1 (figura 14, flecha carril 3) y TcOGG1 (figura 15, flecha carril 3). Finalmente, los constructos fueron sometidos a secuenciación automática de DNA para comprobar la integridad y correcto marco de lectura de ambos genes (figuras 16 y 17).

Los constructos pTREX-GFP-TcNTH1 y pTREX-GFP-TcOGG1 fueron electroporados en epimastigotes en fase exponencial de crecimiento. Luego de 4 a 5 semanas post-transfección se identificó la expresión de las distintas proteínas mediante observación directa al microscopio de fluorescencia. Los epimastigotes transfectados con el plasmidio vacío pTREX-GFP expresan la proteína fluorescente verde GFP en su citoplasma (no mostrado). Sin embargo, la fluorescencia de los parásitos transfectados con los constructos generados para expresar ambas DNA glicosidasas fusionadas a GFP se encuentra más intensa en un área específica del epimastigote (figura 18) que probablemente corresponda al núcleo.

Debido a que la eficiencia de transfección de epimastigotes no fue mayor a 20% para ambos constructos, se realizó un proceso de enriquecimiento de parásitos positivos mediante citometría de flujo “*cell sorter*”, obteniendo sobre un 80% de células transfectadas.

La presencia de TcNTH1-GFP o TcOGG1-GFP en los epimastigotes transfectados también fue evaluada mediante ensayos de *western blot*, utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-GFP y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano. En la figura 19A se observa que TcNTH1-GFP presenta una masa cercana a la esperada (flecha verde, masa molecular de aproximadamente 55 kDa). De manera similar a lo observado para TcNTH1-GFP, la proteína de fusión TcOGG1-GFP presenta una masa cercana a la esperada, aproximadamente 85 kDa (figura 19B, flecha azul). Para ambos ensayos se utilizó como control epimastigotes transfectados con el vector pTREX-GFP vacío que expresan únicamente la proteína GFP de masa molecular cercana a 30kDa (figura 19 A y B, flechas rojas).



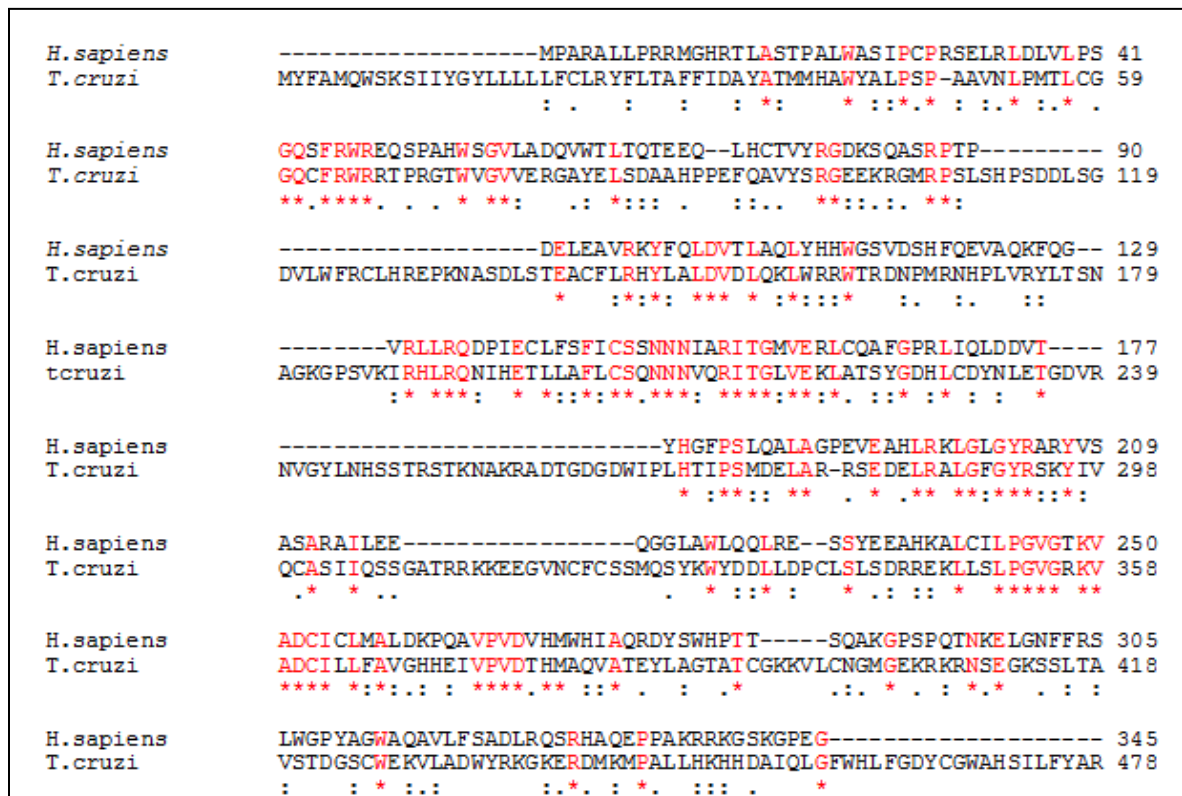
### **3- Evaluación de la viabilidad de los epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-GFP-TcNTH1 y pTREX-GFP-TcOGG1 sometidos a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Con el objetivo de evaluar si la sobreexpresión de las DNA glicosidasas TcNTH1 o TcOGG1 incrementa la viabilidad de *T. cruzi* frente a estrés oxidativo, los epimastigotes transfectados fueron tratados con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 200, 500 y 1000 μM) durante 30min. Posteriormente, se incubaron en medio fresco durante 4 horas para permitir su recuperación (reparación de DNA, Cabrera *et al.*, 2011) y, finalmente, se determinó su viabilidad mediante ensayos de MTT. Cada cepa transformada (pTREX-GFP-TcNTH1 y pTREX-GFP-TcOGG1) fue comparada con controles transfectados con el vector vacío. En la figura 18 se aprecia que la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye la viabilidad de los epimastigotes de forma concentración dependiente. La sobreexpresión de TcNTH1 o TcOGG1 no incrementa ni disminuye de manera significativa la viabilidad de los epimastigotes frente al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 20 A y B).

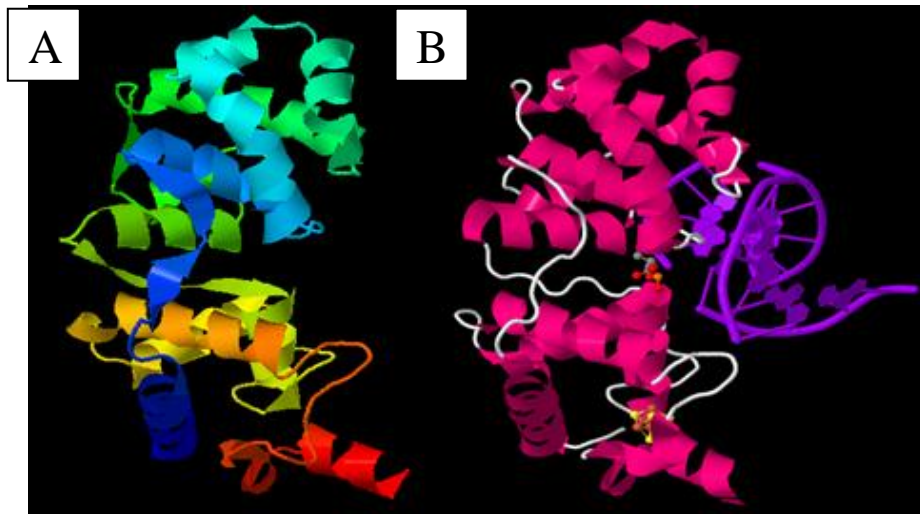
## 9- FIGURAS

T. cruzi	-----MKKHAFGP-----	8
H. sapiens	MTALSARMLTRSRSLGPGAGPRGCREEPGPLRRREAAAEEARKSHSPVKRPRKAQRLRVAY	60
	: : : : *	
T. cruzi	-----PPNWERLYVRVKELREGLDAPVDILGCSKLFDKAALHETR	48
H. sapiens	EGSDSEKGE GAEPLKVPVWE PQDWQQQLVNIRAMRNKKDAPVDHLGTEHCYDSSAPPKVR	120
	* : : : * . : : : * : : : * : : : * : : : * : : : *	
T. cruzi	RYHILLALMLSAQTKDHVTAAMHALIRIGCTPEVIARMPKTKLDGFI SKVGFHNKKAH	108
H. sapiens	RYQVLLSLMLSSQTKDQVTAGAMQRLRARGLTVD SILQTDDATLGKLI YPVGFWRSKVKY	180
	** : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : *	
T. cruzi	IKEATDAILKRHQGRVPHSYEDLIALPGIGPKMAHLFLQEADGVVLGIGVDTHVHRISQR	168
H. sapiens	IKQTSAILQQHYYGDI PASVAELVALPGVGPMAHLAMAVAWGIVSGIAVDTHVHRIANR	240
	** : : : : : : * : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
T. cruzi	FLWVPSTVKTPEDTRKALESWLPRKYWGE INGLLVGLGQTICTPRLPRCSECPASDLCPN	228
H. sapiens	LRWTKKATKSPEETRAALEEWLPRELWHE INGLLVGFQQQTCLPVHPRCHACLNOALCPA	300
	: * . . : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
T. cruzi	AFKEAKRSGKRGVDPDIEDVDTR	251
H. sapiens	AQGL-----	304
	*	

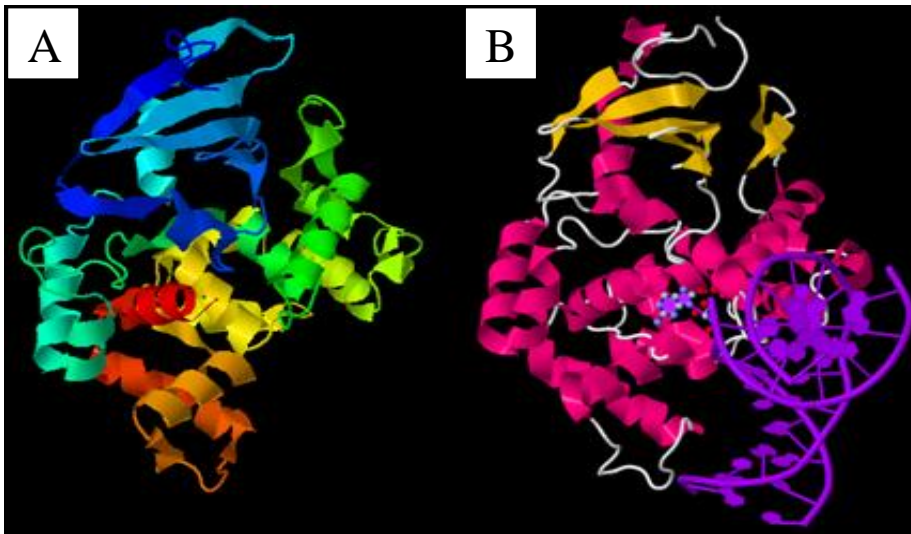
**Figura 3: Alineamiento entre secuencias aminoacídicas de hNTH1 y TcNTH1 realizado mediante el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Los residuos en rojo (\*) corresponden a aminoácidos idénticos entre ambas secuencias (porcentaje de identidad de 35.49 %).**



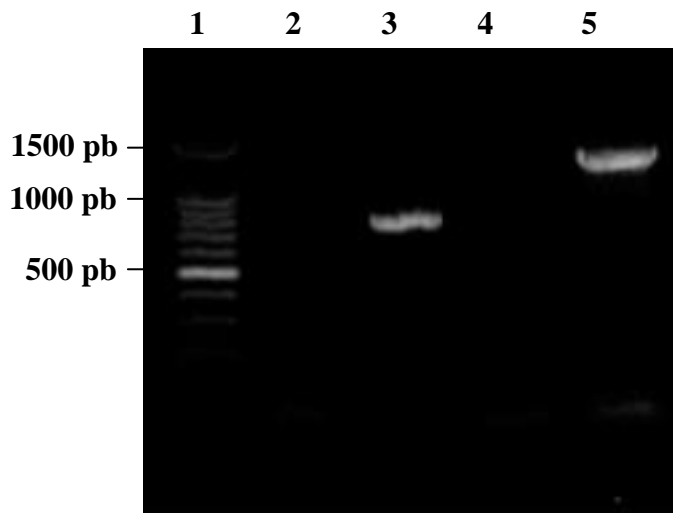
**Figura 4:** Alineamiento entre secuencias aminoacídicas de hOGG1 y TcOGG1 realizado mediante el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Los residuos en rojo (\*) corresponden a aminoácidos idénticos entre ambas secuencias (porcentaje de identidad de 20.29 %).



**Figura 5: Comparación de modelos en 3D de la proteína hipotética TcNTH1 (A) y hNTH1 (B).** Se utilizó el programa Phyre Version 0.2 (*Imperial College of Science Technology and Medicine*), y los resultados de cristalografía para NTH1 humana.



**Figura 6: Comparación de modelos en 3D de la proteína hipotética TcOGG1 (A) y hOGG1 (B).** Se utilizó el programa Phyre Version 0.2 (*Imperial College of Science Technology and Medicine*), y los resultados de cristalografía para OGG1 humana.



**Figura 7: Separación electroforética de amplificadores de DNA de secuencias codificantes para TcNTH1 y TcOGG1 utilizando DNA de epimastigotes de *T. cruzi* como molde. 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega, Chile); 2: control negativo de la técnica de PCR para TcNTH1, sin DNA molde; 3: amplificado de la secuencia nucleotídica de TcNTH1; 4: control negativo de la técnica de PCR para TcOGG1, sin DNA molde; 5: amplificado de la secuencia nucleotídica de TcOGG1.**

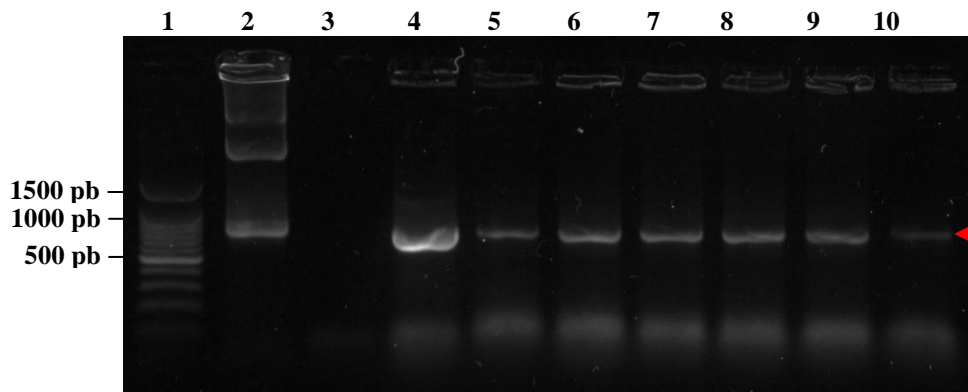
```
CGGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCGG
GTTCCATGAAGAAGCATGCGTTCAAGCCACCGCCCAACTGGGAGAGGTTGTACGTCAGGG
TGAAGGAACTCCGCGAGGGGCTGGAGGCTCCGGTAGACACACTGGGATGCTCGAAACTCT
TTGATAAAGCAGCGTTGCACGAGACGAGACGGTATCATATCCTATTGGCTCTCATGCTGA
GTGCTCAGACAAAAGATCATGTGACGGCGGCGGCAATGCACGCCCTTATTCGAATCGGGT
GTACCCCTGAAGTGATAGCGAAGATGCCGGAGAAGACACTTGATGGATTTATTTCCAAAG
TAGGCTTTCGTAACAAAAAGGCTAAACATATTAAGAGGGCGACAGATGCTATTTTGAAA
GGCATCAAGGGAGGGTGCCGCATTCATACGAGGATCTCATTGCGCTTCCCGGCATTGGTC
CCAAGATGGCCCATCTGTTTCTCCAGGAAGCAGACGGAGTGGTGTGGGCATTGGTGTGG
ATACCCACGTTACCCGCATCAGTCAACGCTTTCTTTGGGTCCCATCGACGGTGAAAACGC
CGGAAGACACACGAAAGGCACTCGAGTCCTGGCTCCCACGGAAGTACTGGGGTGAGATAA
ATGGACTGCTTGTGGGTTTAGGACAAACCATATGTACCCCCGCTTACCGCGTTGTTCCG
AGTGCCAGCTTCGGATCTATGCCCAACGCTTTTAAGGAGGCGAAGAGGAGTGGAAAAG
AGGCAGGTGCCTGATATCGAAGATGTCGATACCCGGTGAAGCTTGGGAATCACTAGTGAA
TTCGCGCCGCTGCAGTCGACCATATGGGAGAGCTCCACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG
TATCTAAGGGTCACTAATAGCTTGGCGTATCATGGTCATAGCTGTTCCCTGGGTGAATGGT
TTCCGCCCAATTCCAACAAATACGAGCCGGAAGCTAAAGGGT
```

**Figura 8: Secuencia nucleotídica codificante para TcNTH1 en el constructo pGEM-T-Easy-TcNTH1, obtenida mediante secuenciación automática de DNA. En rojo se muestra el primer ATG de la secuencia codificante para TcNTH1.**

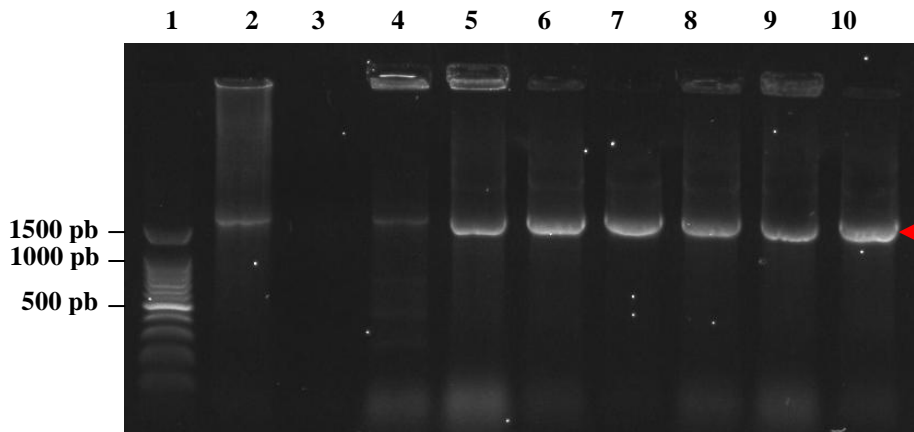
```
ACGATTGGGCCGATGTCGCATGCTCCCGGCTCCATTGGCGGCCGCGGAATTCGATTCGG
GATTCATGTATTTTGGCTATGCAATGGAGTAAATCTGTTATTTATGGTTAGTTGTTGTTGT
TGTTGTCTTCCTTTTGTTTTGCTTGCTTTATTTTTTAACTGCCCTTTTATAGATGCATA
TGCGACCATGATGCACGCTTGGTATGCGCTACCATCCCCGGCAGCGGTGAATCTGCCAAT
GACACTCTGTGGTGGACAGTGTTCGGTGGCGTCCGACACCACGAGGCACATGGGTGG
TGTGGTGGAACGTGGAGCGTACGAACTCTCTGATGCTGCCCATCCGCCCGAATTCAGGC
AGTCCATTACGTGGGGAGGAAAAGCGGGGAATGAGGTCCTCTTTGTCCCATCCTTCTGA
CGACCTCACTGGGGATGTTCTTTGGTTTTGCTGTCTTCATCGTGAGCCAAAGAATGCATT
GGATTTGTCTACAGAAGCTTGTTTTTTGGCGCATTACTTGGCGTTGGATGTGGACTTGCA
GAAATTATGGCGGCGGTGGACACGTGACAATCCCATGAGAGACCATCCTTTGGTTCGTTA
CCTCACCTCGAATGCTGGCAAAGGGCCTTTTGTGAAAATTCGTCATTTGCGACAGAACAT
TCATGAGACCCTTCTAGCATTCTTTGCTCACAGAATAATAACGTACAGCGCATCACAGG
ACTTGTGGAGAAATTGGCCACTTCGTATGGGGACCACTTGTGTGATTACAACCTTGAAAC
ATGCGATGTTTCGAAACGTGGGTTATTTAAATCACAGCTCCACGAGGTCTACAAAAAATGC
AAAAGGGCTGATACTGGAGATGGAGATTGGATACCTTACATACTATCCCAGCATGGAT
GATAGCTAGACGTCGGAAGATGAACTCCGCGCGTTGGGTTTGGGTACCGCAGTAGTACAT
CGTTCATGTGCCTCCATCATCATCAATGGTGCACCAGGCGAAAAGGAGGAGGCGTGAA
```

**Figura 9: Secuencia nucleotídica codificante para TcOGG1 en el constructo pGEM-T-Easy-TcOGG1, obtenida mediante secuenciación automática de DNA.** En rojo se muestra el primer ATG de la secuencia codificante para TcOGG1.

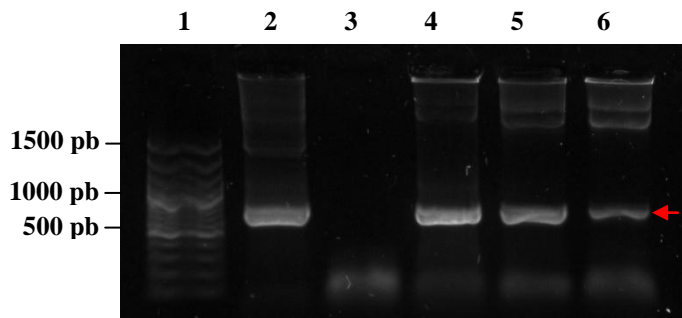




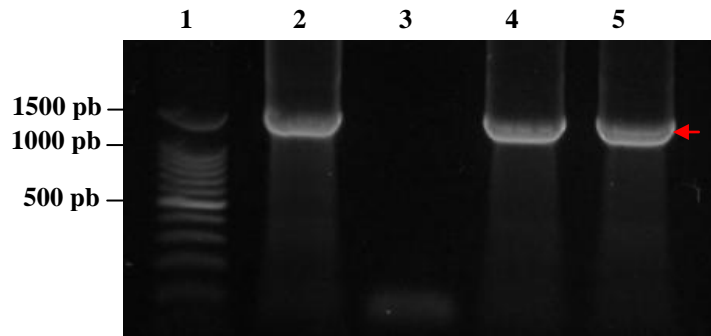
**Figura 10: Comprobación mediante PCR de la presencia de TcNTH1 (←) en colonias de *E. coli* transformadas con el constructo pTREX-GFP-TcNTH1.** 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega, Chile); 2: control positivo (amplificado de TcNTH1 mediante PCR, utilizando el vector pGEM-T-Easy-TcNTH1 como molde); 3: control negativo de la técnica de PCR sin DNA molde; 4-10: amplificados de TcNTH1 utilizando lisados de colonias números 1 al 7 de *E. coli* transformadas con el constructo pTREX-GFP-TcNTH1 como molde.



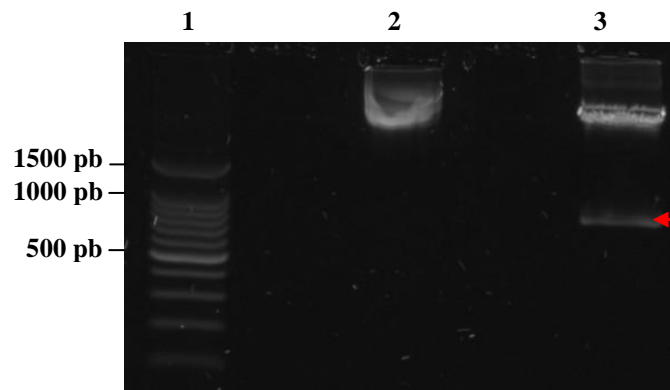
**Figura 11: Comprobación mediante PCR de la presencia de TcOGG1 (←) en colonias de *E. coli* transformadas con el constructo pTREX-GFP-TcOGG1.** 1: marcador de fragmentos de ADN cada 100 pb (Promega, Chile); 2: control positivo (amplificado de TcOGG1 mediante PCR, utilizando el vector pGEM-T-Easy-TcOGG1 como molde); 3: control negativo de la técnica de PCR sin DNA molde; 4-10: amplificados de TcOGG1 utilizando lisados de colonias números 1 al 7 de *E. coli* transformadas con el constructo pTREX-GFP-TcOGG1 como molde.



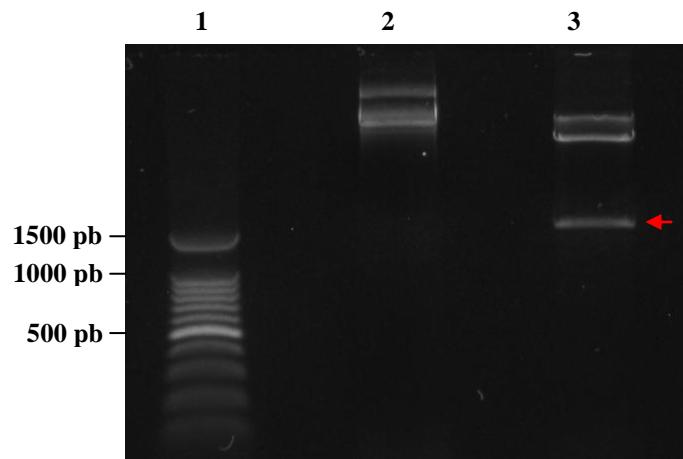
**Figura 12: Confirmación de la inserción de la secuencia nucleotídica codificante para TcNTH1 (←) en el vector de expresión pTREX-GFP-TcNTH1 purificado, mediante ensayos de PCR.** 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Invitrogen); 2: control positivo (amplificado de TcNTH1 mediante PCR, utilizando el vector pGEM-T-Easy-TcNTH1 como molde); 3: control negativo de la técnica de PCR sin DNA molde; 4: amplificado de TcNTH1 utilizando pTREX-GFP-TcNTH1 purificado desde *E. coli* colonia 1 como DNA molde; 5: amplificado de TcNTH1 utilizando pTREX-GFP-TcNTH1 purificado desde *E. coli* colonia 3 como DNA molde; 6: amplificado de TcNTH1 utilizando pTREX-GFP-TcNTH1 purificado desde *E. coli* colonia 7 como DNA molde.



**Figura 13: Confirmación de la inserción de la secuencia nucleotídica codificante para TcOGG1 (←) en el vector de expresión pTREX-GFP-TcOGG1 purificado, mediante ensayos de PCR.** 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega, Chile); 2: control positivo (amplificado de TcOGG1 mediante PCR, utilizando el vector pGEM-T-Easy-TcOGG1 como molde); 3: control negativo de la técnica de PCR sin DNA molde; 4: amplificado de TcOGG1 utilizando pTREX-GFP-TcOGG1 purificado desde *E. coli* colonia 2 como DNA molde; 5: amplificado de TcOGG1 utilizando pTREX-GFP-TcOGG1 purificado desde *E. coli* colonia 7 como DNA molde.



**Figura 14: Identificación mediante digestión enzimática de la presencia del inserto TcNTH1 (←) en el constructo pTREX-GFP-TcNTH1 purificado desde *E. coli* colonia 1.** 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega, Chile); 2: vector pTREX-GFP-TcNTH1 sin digerir; 3: vector pTREX-GFP-TcNTH1 digerido con las enzimas de restricciones *Xba* I y *Hind* III.



**Figura 15: Identificación mediante digestión enzimática de la presencia del inserto TcOGG1 (←) en el constructo pTREX-GFP-TcOGG1 purificado desde *E. coli* colonia 2.** 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega, Chile); 2: vector pTREX-GFP-TcOGG1 sin digerir; 3: vector pTREX-GFP-TcOGG1 digerido con la enzima de restricción *Xba* I.

TcNTH1.Cl.Brener	-----ATGAAGAAGCAT	12
pTRES-TcNTH1	TGATGTCTTTTCTTTTTTTTTTGGCTCTATAAGTTGTCTGTCTAGAATGAAGAAGCAT	180
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	GCGTTCAAGCCGCCCAACTGGGAGAAGTTGTACGTCAGGGTGAAGGAACTCCGCGAG	72
pTRES-TcNTH1	GCGTTCAAGCCGCCCAACTGGGAGAAGTTGTACGTCAGGGTGAAGGAACTCCGCGAG	240
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	GGGCTGGAGGCTCCGGTAGACACACTGGGATGCTCGAAACTCTTTGATAAAGCAGCGTTG	132
pTRES-TcNTH1	GGGCTGGAGGCTCCGGTAGACACACTGGGATGCTCGAAACTCTTTGATAAAGCAGCGTTG	300
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	CACGAGACGAGACGATATCATATCCTATTGGCTCTGATGCTGAGTGCTCAGACAAAAGAT	192
pTRES-TcNTH1	CACGAGACGAGACGATATCATATCCTATTGGCTCTGATGCTGAGTGCTCAGACAAAAGAT	360
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	CATGTGACGGCGGGCAATGCACGCTCTTATTGCAATCGGGTGTACCCCTGAAGTGATA	252
pTRES-TcNTH1	CATGTGACGGCGGGCAATGCACGCTCTTATTGCAATCGGGTGTACCCCTGAAGTGATA	420
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	GCGAAGATGCCGAGAAGACACTTGATGAATTTATTTCCAAAGTAGGCTTTCATAACAAA	312
pTRES-TcNTH1	GCGAAGATGCCGAGAAGACACTTGATGAATTTATTTCCAAAGTAGGCTTTCATAACAAA	480
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	AAGGCTAACATATATAAGAGGCGACAGATGCTATTTGAAAAGGCATCAAGGGAGGGTG	372
pTRES-TcNTH1	AAGGCTAACATATATAAGAGGCGACAGATGCTATTTGAAAAGGCATCAAGGGAGGGTG	540
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	CCGCATTCTACGAGGATCTCATTGCGCTTCCTGGCATTGGTCCCAAGATGGCCCATCTG	432
pTRES-TcNTH1	CCGCATTCTACGAGGATCTCATTGCGCTTCCTGGCATTGGTCCCAAGATGGCCCATCTG	600
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	TTTCTCCAGGAAGCAGACGGAGTGGTGTGGGCATTGGTGTAGATACCCACGTCCACCGC	492
pTRES-TcNTH1	TTTCTCCAGGAAGCAGACGGAGTGGTGTGGGCATTGGTGTAGATACCCACGTCCACCGC	660
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	ATCAGTCAACGCTTTCTTTGGGTCCCATCGACGGTGAACCGCCGGAAGACACACGAAAG	552
pTRES-TcNTH1	ATCAGTCAACGCTTTCTTTGGGTCCCATCGACGGTGAACCGCCGGAAGACACACGAAAG	719
	*****	
TcNTH1.Cl.Brener	GCACTCGAGTCCTGGCTCCACGGAAGTACTGGGGTGAGATAAATGGACTGCTTGTGGGT	612
pTRES-TcNTH1	GCACTCGAGTCCTGGCTCCACGGAAGTACTGGGGTGAGATAAATGGACTGCTTGTGGGT	778
	*****	

**Figura 16.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcNTH1 (clon CL Brenner) con el producto de la secuenciación automática del constructo pTRES-GFP-TcNTH1 (clon Dm28c).** Alineamiento realizado utilizando el programa *Clustal W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). TcNTH1.Cl.Brener: Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcNTH1 (*GenBank accession* XM\_803270.1). pTRES-TcNTH1: Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pTRES-GFP-TcNTH1.

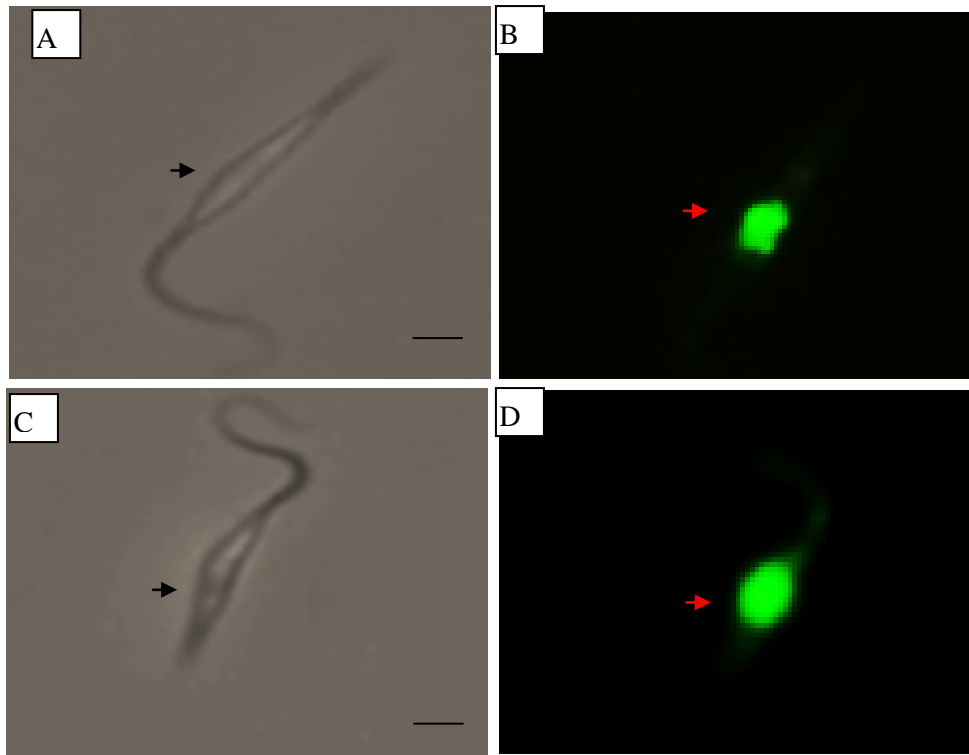
```

TcOGG1.Cl.Brener      -----TATTTTGCTATGCAATGGAGTAAATCTATTAT 54
pTREX-TcOGG1         TCACCATCACCATCACCATCCCGGATGTATTTTGCTATGCAATGGAGTAAATCTGTTAT 240
                        *****
TcOGG1.Cl.Brener      TTATGGTTATTTGTGTTGTTGTTGT-----TTTGCT-GCGTTATTTTAACT 102
pTREX-TcOGG1         TTATGGTTAGTTGTTGTTGTTGTTGTTCTTCCTTTTGGTTTGGCTTGTATTTTAACT 300
                        ***** *
TcOGG1.Cl.Brener      GCCTTTTTTATAGATGCATATGCGACCATGATGCACGCTTGGTATGCGCTACCATCCCCG 162
pTREX-TcOGG1         GCCCTTTTTATAGATGCATATGCGACCATGATGCACGCTTGGTATGCGCTACCATCCCCG 360
                        ***
TcOGG1.Cl.Brener      GCAGCGGTGAATCTGCCAATGACACTCTGTGGTGACAGTGTTCGGTGGCGTCGGACA 222
pTREX-TcOGG1         GCAGCGGTGAATCTGCCAATGACACTCTGTGGTGACAGTGTTCGGTGGCGTCGGACA 420
                        *****
TcOGG1.Cl.Brener      CCACGAGGCACATGGGTTGGTGTGGTGGAAACGTGGAGCGTACGAACTCTCTGATGCTGCC 282
pTREX-TcOGG1         CCACGAGGCACATGGGTTGGTGTGGTGGAAACGTGGAGCGTACGAACTCTCTGATGCTGCC 480
                        *****
TcOGG1.Cl.Brener      CATCCGCCGAATTCAGGCAGTCTATTACGTTGGGAAGAAAAGCGGGGAATGAGGCC 342
pTREX-TcOGG1         CATCCGCCGAATTCAGGCAGTCCATTACGTTGGGAAGAAAAGCGGGGAATGAGGTCC 540
                        *****
TcOGG1.Cl.Brener      TCTTTGTCCCATCCTTCTGACGACCTCTCTGGGGATGTTCTTTGGTTTCGCTGTCTTCAT 402
pTREX-TcOGG1         TCTTTGTCCCATCCTTCTGACGACCTCACTGGGGATGTTCTTTGGTTTCGCTGTCTTCAT 600
                        *****
TcOGG1.Cl.Brener      CGTGAGCCAAAGAATGCATCGGATTTGTCTACAGAAGCCTGTTTTTTGCGGCATTACTTTG 462
pTREX-TcOGG1         CGTGAGCCAAAGAATGCATCGGATTTGTCTACAGAAGCCTGTTTTTTGCGGCATTACTTTG 660
                        *****
TcOGG1.Cl.Brener      GCGTTGGATGTGGACCT-GCAGAAATATGGCGGGTGGACACGTGACAAT-CCCATGA 520
pTREX-TcOGG1         GCGTTGGATGTGGACTTTGCAGAAATATGGCGGAGGTGGACACGTGACTATCCCATGA 720
                        ***** *
TcOGG1.Cl.Brener      GAAACCATCCTTTGGTTCGTTACCTCACCTCAA-TGCTGGCAAAGGCCTTCTGTGAAA 579
pTREX-TcOGG1         AAGACCATCCTTTGGTTCGTTACCTCACCTCGAAATGCTG----- 760
                        * *****

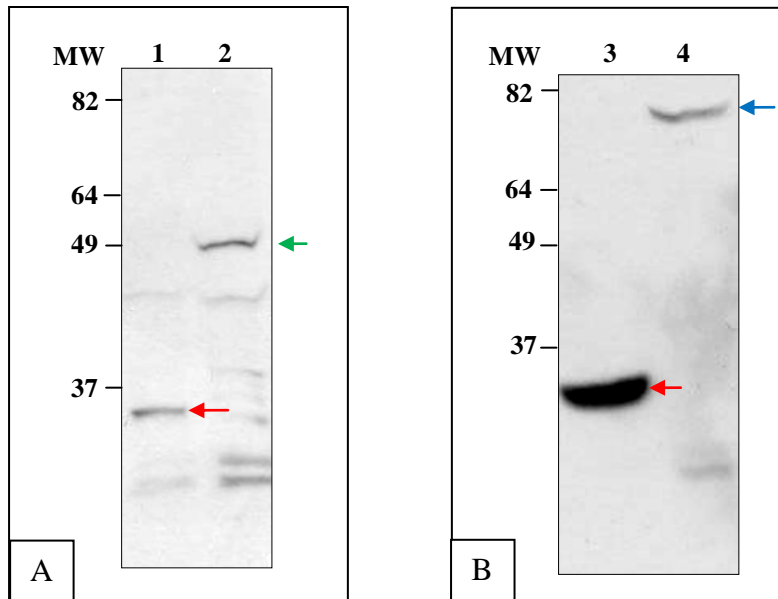
```

**Figura 17.- Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para TcOGG1 (clon CL Brenner) con el producto de la secuenciación automática del constructo pTREX-GFP-TcOGG1 (clon Dm28c).** Alineamiento realizado utilizando el programa *Clustal W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). TcOGG1.Cl.Brener: Secuencia nucleotídica del gen codificante para TcOGG1 (*GenBank accession XM\_816703*). pTREX-TcOGG1: Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pTREX-GFP-TcOGG1.

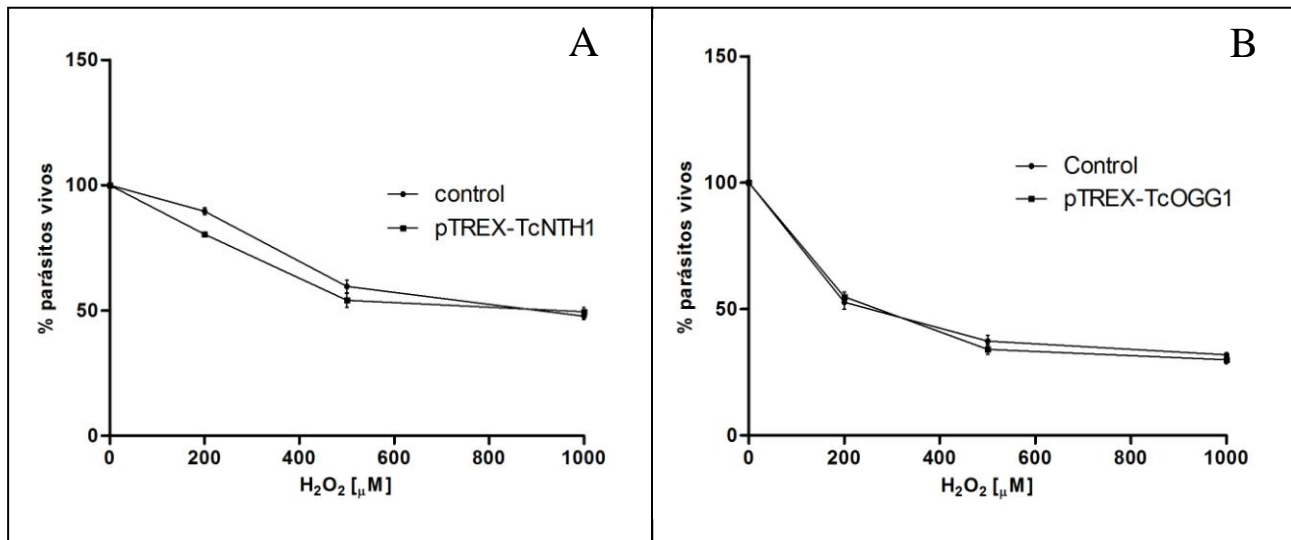




**Figura 18: Localización de TcNTH1-GFP y TcOGG1-GFP en epimastigotes transfectados.** Epimastigotes transfectados con los plasmidios pTREX-GFP-TcNTH1 (A y B) o pTREX-GFP-TcOGG1 (C y D) fueron observados al fresco en un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro de  $520\pm 20$  nm para determinar la expresión y la localización de las respectivas proteínas de fusión. A y C: contraste de fases. B y D: detección de fluorescencia verde. Flechas: parásitos expresando TcNTH1-GFP (B) o TcOGG1-GFP (D). Barra  $10\mu\text{m}$ .



**Figura 19: Expresión de TcNTH1-GFP y TcOGG1-GFP en epimastigotes transfectados.** Identificación de TcNTH1-GFP (A) y TcOGG1-GFP (B) mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. 1 y 3: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con el vector vacío pTREX-GFP, expresando GFP (←); 2 y 4: Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con el constructo pTREX-GFP-TcNTH1 o pTREX-GFP-TcOGG1 expresando TcNTH1-GFP (←) o TcOGG1-GFP (←), respectivamente. MW: marcador de masa molecular (kDa).



**Figura 20: Evaluación de la viabilidad de epimastigotes transfectados sometidos a estrés oxidativo.** Epimastigotes que sobreexpresan TcNTH1 (A) o TcOGG1 (B) y sus controles fueron tratados durante 30 min a 28°C con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, los parásitos fueron incubados en medio fresco durante 4 horas a 28°C. El análisis de viabilidad se realizó mediante ensayos de MTT y los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente en el programa *Graph Pad Prism*.

## 10- DISCUSIÓN

En células eucariontes, las ROS producidas por el metabolismo aeróbico basal son una de las mayores causantes de daño al DNA. Se estima que cada  $10^6$  pares de bases nitrogenadas en el DNA, se generará una base oxidada producto de especies reactivas formadas en la mitocondria (Frelon *et al.*, 2000). Por tal motivo, durante la evolución, los diversos organismos vivos desarrollaron diferentes mecanismos de reparación de DNA los que generalmente son altamente conservados desde bacterias hasta mamíferos. La vía de reparación por escisión de bases BER, es uno de los principales mecanismos de reparación frente a daño oxidativo del DNA en eucariontes (Ide y Kotera, 2004).

Proteínas ortólogas de hNTH1 y hOGG1 de humanos han sido identificadas en diversos organismos como bacterias, levaduras, plantas, gusanos y ratones (Aspinwall *et al.*, 1997; Sarker *et al.*, 1998; Eide *et al.*, 1996; Roldán-Arjona *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1994; van der Kemp *et al.*, 1996; Rosenquist *et al.*, 1997; Guibourt y Boiteux, 2000; Dany y Tissier, 2001; Morinaga *et al.*, 2009). Ambas proteínas, así como todas las DNA glicosidasas pertenecientes a la súper familia Nth, comparten una estructura similar caracterizada por la presencia de dos dominios de  $\alpha$ -hélices, un motivo hélice-vuelta-hélice, involucrado en la unión a la hebra de DNA, y un motivo de unión a 4 moléculas de hierro y 4 moléculas de azufre (Hazra *et al.*, 2007; Zarkov, 2008). En esta memoria de título se identificó, en el genoma de *T. cruzi*, las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las proteínas TcNTH1 y TcOGG1, ortólogas de hNTH1 y hOGG1 de humano, respectivamente. Ambas DNA glicosidasas fueron clonadas en plasmidios de *E. coli*. El grado de identidad de las secuencias aminoacídicas deducidas para NTH1 y OGG1 entre *T. cruzi* y *Homo sapiens* fue de 20.29 % y 35,49%, respectivamente. Porcentajes similares de identidad han sido establecidos entre ortólogos de OGG1 de *H. sapiens* y *S. cerevisiae* (33% de identidad) (Rykhlevskaia y Kuznetsova, 2000). El modelamiento 3D de TcNTH y TcOGG1, basado en la cristalografía de NTH1 y OGG1 de humanos, respectivamente, muestra conservación de los dominios característicos descritos para DNA glicosidasas de la súper familia Nth (Boiteux y Radicella, 2000; David *et al.*, 2007).

Estudios realizados en ratones carentes de NTH1 u OGG1 determinaron la ausencia de alteraciones patológicas o de desarrollo de neoplasias (Klungland *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 2006; Takao *et al.*, 2002a). Sin embargo, diversos reportes demostraron un incremento en los niveles de

8-oxoG en el DNA de ratones *knock-out* para OGG1. A pesar de que el incremento de 8-oxoG se relaciona a un aumento de la frecuencia de mutaciones, sólo fue posible detectar cambios de la secuencia de DNA en tejidos con bajo índice proliferativo (Arai *et al.*, 2006; Hirano, 2008). Por otra parte, se ha informado que células embrionarias murinas *knock-out* para NTH1 no presentan mayor sensibilidad a peróxido de hidrógeno o menadiona (Takao *et al.*, 2002a). Adicionalmente, estos autores señalan que las moléculas de timina glicol producidas en el DNA hepático de ratones *knock-out* para NTH1, luego de exposición a rayos X, desaparece con el tiempo. Estos resultados sugieren fuertemente la existencia de mecanismos alternativos de reparación del DNA o la existencia de otras DNA glicosidasas capaces de reparar bases oxidadas en ratones carentes de OGG1 o NTH1. Muchos autores sugieren que esto último estaría dado por la actividad DNA glicosidasa de NEIL1 o NEIL2 (Takao *et al.*, 2002a; Takao *et al.*, 2002b; Hegde *et al.*, 2008; Hegde *et al.*, 2012; Grin y Zharkov, 2011). En esta memoria de título no fue posible identificar en *T. cruzi* secuencias ortólogas para DNA glicosidasas de la familia *Nei-like*.

En contraste, en eucariontes unicelulares como *S. cerevisiae*, la inactivación de OGG1 genera un importante incremento de transversiones espontáneas G:C a T:A (Thomas *et al.*, 1997; Boiteux *et al.*, 2002). Resultados similares fueron reportados para *S. cerevisiae* carentes de las DNA glicosidasas Ntg1 y Ntg2 (Alseth *et al.*, 1999).

En relación a la sensibilidad que presentan levaduras *knock-out* para glicosidasas expuestas a agentes genotóxicos, aún existe gran controversia. Experimentos realizados por Eide *et al.* (1996) indican que células de *S. cerevisiae* carentes de Ntg1 son más sensibles a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona. Sin embargo, contrariamente, Swanson *et al.* (1999) señalan que la carencia de Ntg1, Ntg2 o ambas DNA glicosidasas en levaduras, no incrementa la sensibilidad de estas células expuestas a éstos agentes oxidantes. Por otra parte, estudios realizados por Thomas *et al.* (1997) determinaron que la ausencia del gen codificante para OGG1 en levaduras tampoco genera un incremento de la sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radiación gama, metilmetanosulfonato y radiación UV. En contraste, Melo *et al.* (2004) señalan que células de *S. cerevisiae* carentes de OGG1 son más sensibles a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Considerando que: (i) aún no han sido descritos inhibidores de DNA glicosidasas relacionadas con la reparación de bases nucleotídicas oxidadas, (ii) las técnicas de *knock-out* genéticos en *T. cruzi* son complejas y presentan un bajo porcentaje de éxito (Xu *et al.*, 2009) y

(iii) no es posible aplicar técnicas de RNAi en este protozooario (DaRocha *et al.*, 2004), en esta memoria de título se optó por una aproximación experimental basada en la sobreexpresión de TcNTH1 y TcOGG1 en epimastigotes de *T. cruzi*. La sobreexpresión de enzimas que participan en la vía BER ha sido un método ampliamente utilizado en distintos modelos, para estudiar los mecanismos de reparación frente a distintos agentes que dañan el DNA (Frosina, 2000). Al respecto, la sobreexpresión de OGG1 en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano redujo el nivel de daño oxidativo en DNA nuclear, pero no incrementó la sobrevivencia celular luego de exposición a ROS (Lu *et al.*, 2004). En contraste, la sobreexpresión de OGG1 o NTH1 en células linfoblastoides TK6 incrementó significativamente la sobrevivencia frente a la exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yang *et al.*, 2006). De manera similar, la sobreexpresión de OGG1 en mitocondrias de fibroblastos de ratón incrementó la viabilidad celular luego de exposición a ROS (Rachek *et al.*, 2002). También en células embrionarias de riñón humano (HEK 293) se observó que la sobreexpresión de OGG1 aumentó la reparación de 8-oxoG del DNA nuclear y mitocondrial, reduciendo la mortalidad frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona, cisplatino y oxaliplatino (Preston *et al.*, 2009).

En esta memoria de título se investigó el efecto de la sobreexpresión de las enzimas DNA glicosidasas TcNTH1 y TcOGG1 en la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* sometidos a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No se encontraron diferencias significativas entre parásitos transfectados con vectores que sobreexpresan las DNA glicosidasas comparados con sus controles.

Si bien se han descrito diferencias en los niveles de síntesis y expresión de los genes codificantes para hNTH1 y hOGG1 en las diferentes etapas del ciclo celular (Luna *et al.*, 2000), se desconoce si esto ocurre en *T. cruzi*. Sin embargo, el vector de expresión pTREX-GFP está asociado a un promotor ribosomal que asegura la expresión constitutiva de las proteínas recombinantes. Por tal motivo, la ausencia de diferencias significativas en la viabilidad de parásitos transfectados comparados a los controles, observadas en esta memoria de título, no puede asociarse a poblaciones parasitarias que se encuentran en diferentes etapas del ciclo celular.

Por otra parte, se ha observado que algunos tipos de células neoplásicas presentan una menor actividad de la vía BER, que se manifiesta como una disminución de la síntesis del mRNA

que codifica para DNA glicosidasas, así como una alteración en la importación de estas enzimas al núcleo. Como resultado es posible observar mayores niveles de hNTH1 en el citoplasma de este tipo de células (Goto *et al.*, 2009; Koketsu *et al.*, 2004). En relación a lo anterior, nuestros resultados de microscopia de fluorescencia, además de estudios paralelos de inmunofluorescencia (datos no mostrados) localizan las DNA glicosidasas transfectadas en el núcleo de epimastigotes de *T. cruzi*, coincidiendo con lo descrito por Luna *et al.* (2005) para DNA glicosidasas de eucariontes recientes. En consecuencia, es poco probable que una menor actividad de las enzimas transfectadas se encuentre asociada a una alteración en su localización subcelular. Sin embargo, no se puede descartar una activación insuficiente de BER debido a que sólo se está expresando una enzima de la vía, como ha sido propuesto por Ma *et al.* (2008). Otra posibilidad es que los niveles de DNA glicosidasas endógenas sean suficientes para lidiar con el daño oxidativo generado por ROS y por lo tanto, sólo sería posible evidenciar un incremento de la reparación y de la viabilidad de los parásitos al cotransfectar con otras enzimas participantes de la vía BER. Finalmente, se deben realizar ensayos funcionales de cinética enzimática de TcNTH1-GFP y TcOGG1-GFP para asegurar que ambas DNA glicosidasas se encuentren activas, objetivo en los que ya nos encontramos trabajando.

Durante la redacción de esta memoria de título se publicó un trabajo en el cual los autores sobreexpresan TcOGG1 en epimastigotes de *T. cruzi*. A pesar de que los parásitos que sobreexpresan esta enzima reparan más eficientemente su DNA nuclear y mitocondrial, presentan una mayor sensibilidad frente a exposiciones con 200 y 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cabe mencionar que fue necesario incubar los parásitos durante 72 horas con este agente oxidante para observar diferencias significativas en la viabilidad de epimastigotes transfectados. Con esos resultados, los autores sugieren que la sobreexpresión de TcOGG1 incrementaría los niveles de eliminación de bases oxidadas, generando gran cantidad de sitios apurínico/apirimidínicos altamente nocivos, los cuales no pueden ser reparados eficientemente por el resto de las enzimas de la vía BER (Furtado *et al.*, 2012).

## 11 - CONCLUSIÓN

La sobreexpresión de TcNTH1 o TcOGG1 no incrementa la viabilidad de epimastigotes expuestos a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en las condiciones experimentales utilizadas.



## 12- 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): 721-731.
2. **ALIBERTI, J.C.; SOUTO, J.T.; MARINO, A.P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M.M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S.** 2001. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 158(4): 1433-1440.
3. **ALSETH, I.; EIDE, L.; PIROVANO, M.; ROGNES, T.; SEEBERG, E.; BJØRÅS, M.** 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Mol Cell Biol.* 19(5): 3779-3787.
4. **ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W.** 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 3(10): 819-823.
5. **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.M.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chilena Infectol.* 25(3): 189-193.
6. **ARAI, T.; KELLY, V.P.; MINOWA, O; NODA, T.; NISHIMURA, S.** 2006. The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA. *Toxicology.* 221(2-3): 179-186.
7. **ASPINWALL, R.; ROTHWELL, D.G.; ROLDÁN-ARJONA, T.; ANSELMINO, C.; WARD, C.J.; CHEADLE, J.P.; SAMPSON, J.R.; LINDAHL, T.; HARRIS, P. C.; HICKSON, I.D.** 1997. Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(1): 109-14.
8. **BERN, C.** 2011. Antitrypanosomal therapy for Chronic Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 364: 2527-2534.
9. **BOITEUX, S.; RADICELLA, J.P.** 2000. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 377(1): 1-8.
10. **BOITEUX, S.; GELLON, L.; GUIBOURT, N.** 2002. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 32(12):1244-1253.

11. 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): 2189-99.
12. CARVAJAL, A.; ORELLANA, J.; WIGANT, W.; BÓRQUEZ, C.; LOBATO, I. 2007. Prevalence of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* in the coast of Arica city. *Parasitol Latinoam.* 62(3-4): 118 -121.
13. CAVALIER-SMITH, T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 57(4): 953-994.
14. COURA, J.R. 2007. Chagas disease: What is known and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(1): 113-122.
15. DANY, A.L.; TISSIER, A. 2001. A functional OGG1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics.* 265(2): 293-301.
16. DAROCHA, W.D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S.M.; DONELSON, J.E. 2004. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 133(2): 175-186.
17. DAVID, S.S.; O'SHEA, V.L.; KUNDU, S. 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* 447(7147): 941-950.
18. DE SOUZA, W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8(4): 269-285.
19. DIAS, J.C. 2007. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 23(1): S13-S22
20. EIDE, L.; BJØRÅS, M.; PIROVANO, M.; ALSETH, I.; BERDAL, K. G.; SEEBERG, E. 1996. Base excision of oxidative purine and pyrimidine DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* by a DNA glycosylase with sequence similarity to endonuclease III from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(20): 10735-40.
21. FÁREZ-VIDAL, M.E.; GALLEGO, C.; RUIZ-PÉREZ, L.M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. 2001. Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 29(7): 1549-1555.
22. FORTINI, P.; PARLANTI, E.; SIDORKINA, O.M.; LAVAL, J.; DOGLIOTTI, E. 1999. The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem.* 274(21): 15230-15236.
23. FRELON, S.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L.; POUGET J.P., TORNABENE, C.; CADET, J. 2000. High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry

- measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol.* 13(10): 1002-1010.
24. **FROSINA, G.** 2000. Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *Eur J Biochem.* 267(8): 2135-2149.
  25. **FURTADO C, KUNRATH-LIMA M, RAJÃO MA, MENDES IC, DE MOURA MB, CAMPOS PC, MACEDO AM, FRANCO GR, PENA SD, TEIXEIRA SM, VAN HOUTEN B, MACHADO CR.** 2012. Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 7(8): e42484.
  26. **GOTO, M.; SHINMURA, K.; IGARASHI, H.; KOBAYASHI, M.; KONNO, H.; YAMADA, H.; IWAIZUMI, M.; KAGEYAMA, S.; TSUNEYOSHI, T.; TSUGANE, S.; SUGIMURA, H.** 2009. Altered expression of the human base excision repair gene *NTH1* in gastric cancer. *Carcinogenesis.* 30(8): 1345-1352.
  27. **GRAÇA-SOUZA, A.V.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G.O.; BRAZ G,R.; PAES, M.C.; SORGINE, M.H.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L.** 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol.* 36(4): 322-335.
  28. **GRIN, I.R.; ZHARKOV, D.O.** 2011. Eukaryotic endonuclease VIII-like proteins: new components of the base excision DNA repair system. *Biochemistry (Mosc).* 76(1): 80-93.
  29. **GUIBOURT, N.; BOITEUX, S.** 2000. Expression of the Fpg protein of *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on spontaneous mutagenesis and sensitivity to oxidative DNA damage. *Biochimie.* 82(1): 59-64.
  30. **GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J.J.; WU, Y.; HUANG, M.H.; GARG, N.J.** 2009. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med.* 47(10): 1414-1421.
  31. **HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219(1):1-14.
  32. **HAZRA, T.K.; DAS, A.; DAS, S.; CHOUDHURY, S.; KOW, Y.W.; ROY, R.** 2007. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst).* 6(4): 470-480.
  33. **HEGDE, M.L.; HAZRA, T.K.; MITRA, S.** 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18(1): 27-47.
  34. **HEGDE, M.L.; MANTHA, A.K.; HAZRA, T.K.; BHAKAT, K.K.; MITRA, S.; SZCZESNY, B.** 2012. Oxidative genome damage and its repair: Implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev.* 133(4): 157-168.

35. **HIRANO, T.** 2008. Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. *J Radiat Res.* 49(4): 329-340.
36. **HOEIJMAKERS, J.** 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 411: 366-374.
37. **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.
38. **IDE, H. KOTERA, M.** 2004. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull.* 27(4): 480-485.
39. **KLUNGLAND, A.; ROSEWELL, I.; HOLLENBACH, S.; LARSEN, E.; DALY, G.; EPE, B.; SEEBERG, E.; LINDAHL, T.; BARNES, D.E.** 1999. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(23): 13300-13305.
40. **KOKETSU, S.; WATANABE, T.; NAGAWA, H.** 2004. Expression of DNA repair protein: MYH, NTH1, and MTH1 in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 51(57): 638-642.
41. **KUMAR, P.; KUMAR, S.; VARSHNEY, U.** 2011. Uracil excision repair in *Mycobacterium tuberculosis* cell-free extracts. *Tuberculosis (Edinb).* 91(3): 212-218.
42. **LU, T.; PAN, Y.; KAO, S.Y.; LI, C.; KOHANE, I.; CHAN, J.; YANKNER, B.A.** 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature.* 429(6994): 883-891.
43. **LUNA, L.; BJØRÅS, M.; HOFF, E.; ROGNES, T.; SEEBERG, E.** 2000. Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA. *Mutat Res.* 460(2): 95-104.
44. **LUNA, L.; ROLSETH, V.; HILDRESTRAND, G. A.; OTTERLEI, M.; DANTZER, F.; BJØRÅS, M.; SEEBERG, E.** 2005. Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys<sup>326</sup> polymorphic variant. *Nucleic Acids Res.* 33(6): 1813-1824.
45. **MA, H.; SHIEH, K.J.** 2006. Western Blotting Method. *J Am Sci.* 2(2): 23-27.
46. **MA, H.; WANG, J.; ABDEL-RAHMAN, S.; BOOR, P.J.; KHAN, M.F.** 2008. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen, following subchronic exposure to aniline. *Toxicol Appl Pharmacol.* 233(2): 247-253.

47. MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.; MESTRINER, F.L.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 102(24): 3003-3008.
48. MELO, R.G.M.; LEITAO, A.C.; PADUA, M. 2004. Rol of OGG1 and NTG2 in the repair of oxidative DNA damage and mutagenesis induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with transition metals iron and copper. *Yeast*. 21(12): 991-1003.
49. MINSAL-MINISTERIO DE SALUD DE CHILE. 2012. Informe situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas. Situación 2007-2012. [en línea]. <[http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/EnfChagas/Chagas\\_sem252012.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/EnfChagas/Chagas_sem252012.pdf)>. [consulta: 24-8-12].
50. MORINAGA, H.; YONEKURA, S.; NAKAMURA, N.; SUGIYAMA, H.; YONEI, S.; ZHANG-AKIYAMA, Q.M. 2009. Purification and characterization of *Caenorhabditis elegans* NTH, a homolog of human endonuclease III: essential role of N-terminal region. *DNA Repair (Amst)*. 8(7): 844-851.
51. PAES, M.C.; CONSENTINO-GOMES, D.; FERNANDES DE SOUZA, C.; PEREIRA DE ALMEIDA NOGUERIA, N.; MEYER-FERNANDES, J.R. 2011. The role of heme and reactive oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res*. 2011(174614): 1-8.
52. PÉREZ, J.; GALLEGO, C.; BERNIER-VILLAMOR, V.; CAMACHO, A.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; RUIZ-PÉREZ, L.M. 1999. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the Trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 27(3): 771-777.
53. PIACENZA, L.; ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; RADI, R. 2009. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol*. 12(4): 415-421.
54. PRATA, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 1(2): 92-100.
55. PRESTON, T.J.; HENDERSON, J.T.; MCCALLUM, G.P.; WELLS, P.G. 2009. Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs. *Mol Cancer Ther*. 8(7): 2015-2026.
56. RACHEK, L.I.; GRISHKO, V.I.; MUSIYENKO, S.I.; KELLEY, M.R.; LEDOUX, S.P.; WILSON, G.L. 2002. Conditional targeting of the DNA repair enzyme hOGG1 into mitochondria. *J Biol Chem*. 277(47): 44932-44937.

57. **RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A.** 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375(9723): 1388-1402.
58. **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.
59. **ROLDÁN-ARJONA, T.; GARCÍA-ORTIZ, M.V.; RUIZ-RUBIO, M.; ARIZA, R.R.** 2000. cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* DNA repair enzyme endonuclease III. *Plant Mol Biol*. 44(1): 43-52.
60. **ROSENQUIST, T.A.; ZHARKOV, D.O.; GROLLMAN, A.P.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(14): 7429-7434.
61. **ROZAS, M.; DE DONCKER, S.; CORONADO, X.; BARNABÉ, C.; TIBYARENC, M.; SOLARI, A.; DUJARDIN, J.C.** 2008. Evolutionary history of *Trypanosoma cruzi* according to antigen genes. *Parasitology*. 135(10): 1157-1164.
62. **RYKHLEVSKAIA, A.I.; KUZNETSOVA, S.A.** 2000. Mono- and bifunctional DNA-glycosylases participating in repair of oxidative damage of DNA. *Mol Biol (Mosk)*. 34(6): 1007-1024.
63. **SARKER, A.H.; IKEDA, S.; NAKANO, H.; TERATO, H.; IDE, H.; IMAI, K.; AKIYAMA, K.; TSUTSUI, K.; BO, Z.; KUBO, K.; YAMAMOTO, K.; YASUI, A.; YOSHIDA, M. C.; SEKI, S.** 1998. Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of *Escherichia coli* endonuclease III. *J Mol Biol*. 282(4): 761-774.
64. **SIBLEY, L.D.** 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev*. 240(1): 72-91.
65. **SWANSON, R.L.; MOREY, N.J.; DOETSCH, P.W.; JINKS-ROBERTSON, S.** 1999. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 19(4): 2929-2935.
66. **TAKAO, M.; KANNO, S.; KOBAYASHI, K.; ZHANG, Q. M.; YONEI, S.; VAN DER HORST, G. T., YASUI, A.** 2002a. A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. *J Biol Chem*. 277(44): 42205-42213.
67. **TAKAO, M.; KANNO, S.; SHIROMOTO, T.; HASEGAWA, R.; IDE, H.; IKEDA, S.; SARKER, A.H.; SEKI, S.; XING, J.Z.; LE, X.C.; WEINFELD, M.; KOBAYASHI, K.; MIYAZAKI, J.; MULJTJENS, M.; HOEIJMAKERS, J.H.; VAN DER HORST, G.; YASUI, A.** 2002b. Novel nuclear and mitochondrial glycosylases

revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols. *EMBO J.* 21(13): 3486-3493.

68. **TANOWITZ, H.B.; WEISS, L.M.; MONTGOMERY, S.P.** 2011. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(4): e1136.
69. **TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N.** 2006. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(5): 463-491.
70. **TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A.** 2008. Chagas disease. *Postgrad Med J.* 82(974): 788-798.
71. **THOMAS, D.; SCOT, A.D.; BARBEY, R.; PADULA, M.; BOITEUX, S.** 1997. Inactivation of OGG1 increases the incidence of G. C-->T. A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet.* 254(2): 171-178.
72. **TYLER, K.; ENGMAN, D.M.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31(5-6): 472-481.
73. **URBINA, J.A.; DOCAMPO, R.** 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19(11): 495-501.
74. **VAN DER KEMP, P.A.; THOMAS, D.; BARBEY, R.; DE OLIVEIRA, R.; BOITEUX, S.** 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(11): 5197-5202.
75. **WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2002. Control of Chagas disease. Second Report of the Who Expert Committee. Geneva, Switzerland. [en línea]. <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_905.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf)>. [consulta: 20-09-11].
76. **WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. [en línea]. <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR\\_SWG\\_09\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf)>. [consulta: 12-09-11].
77. **WILSON, R.; AINSCOUGH, R.; ANDERSON, K.; BAYNES, C.; BERKS, M.; BONFIELD, J.; BURTON, J.; CONNELL, M.; COPSEY, T.; COOPER, J.** 1994. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature.* 368(6466): 32-38.
78. **XU, D.; BRANDÁN, C.P.; BASOMBRÍO, M.A., TARLETON, R.L.** 2009. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.* 9:90.

79. **YANG, N.; CHAUDHRY, M.A.; WALLACE, S.S.** 2006. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells. *DNA Repair (Amst)*. 5(1): 43-51.
80. **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*. 3(7): e488.
81. **ZACKS, M.A.; WEN, J.J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N.** 2005. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc*. 77(4): 695-715.
82. **ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J.C.; ORTIZ-ORTIZ, L.** 2002. How protozoan parasites evade the immune. *Trends Parasitol*. 18(6): 272-278.
83. **ZARKOV, O.D.** 2008. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci*. 65(10): 1544-1565.
84. **ZINGALES, B.; ANDRADE, S.; BRIONES M.; CAMPBELL, D.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.; MACHADO, C.; MILES, M.; ROMAHNA, 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.