



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

**EXPRESIÓN DE HISTONAS H2A DE FENOTIPO SILVESTRE Y
MUTANTES EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi***

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

PROFESOR GUÍA: GONZALO CABRERA VALLEJOS

FINANCIAMIENTO: Proyectos Fondecyt 11100053 y 1130113

SANTIAGO, CHILE
2014



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

**EXPRESIÓN DE HISTONAS H2A DE FENOTIPO SILVESTRE Y
MUTANTES EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi***

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

Nota Final

FIRMA

Profesor Guía	: Gonzalo Cabrera
Profesor Corrector	: Fernando Fredes
Profesor Corrector	: Sergio Bucarey

SANTIAGO, CHILE
2014

DEDICATORIA

A la memoria del inolvidable Hugo Julio, mi padre.

A Lucía Kalajzić, mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre por permitirme realizar mis propias elecciones y ayudarme a llevarlas a cabo aunque él no estuviese necesariamente de acuerdo, por su completa entrega, por sus enseñanzas y consejos; desearía haberlo tenido conmigo por más que solo veinte años. A mi madre por escucharme siempre y entenderme, por confiar en mí y darme fuerzas para continuar. Gracias a ambos por haberme criado con tanto amor y estar conmigo incondicionalmente. A mis hermanas Lucía, Liliana y Francisca por soportarme y quererme como soy, especialmente a Francisca por ser mi mejor amiga y el recuerdo más lindo que tengo de mi papá.

A mis grandes amigos, que conocí estudiando la carrera: Claudia Lobos, Gaspar, Claudia Saldívar, Constanza, Nataly, Francisca y Christiane. Gracias por los buenos momentos, los millones de risas, por su compañía y por sostenerme en los momentos más difíciles.

A mis queridas familias adoptivas, que han hecho más dulce y liviana mi estadía en esta ciudad, desde que llegué hasta el último tiempo: Torres Mora, Saldívar Ferrer, Ramos Oliver, Lobos Fuentes, Vásquez Arévalo y Tapia Chandía. Gracias por acogerme en sus casas, ayudarme, escucharme, cuidarme y mimarme como si fuera una hija más.

A mi tía Orieta y a Gastón por hacer más ligero el peso sobre nuestros hombros.

Gracias a Santiago por su enorme apoyo y cariño durante años, y por introducirme al laboratorio. A Gilda, que me inició en las técnicas básicas para realizar esta memoria, y a Lucía por instruirme en las más complejas. A Iván y Sofía por enseñarme tantas cosas, por su eterna paciencia y buena disposición para responder todas mis preguntas que nunca acababan, y por socorrerme en más de una ocasión. A Iván también por darme confianza y entregarme la suya, por sus consejos de sabiduría oriental, por invitarme el café con vainilla del quiosco y por sacarme risas y sonrisas con simplezas como la del biólogo ñoño *outdoor*. A Fernando por enseñarme y ayudarme a hacer el último ensayo, y por ser una excelente persona. A Camila por darme su amistad y compañía al poco tiempo de conocernos. Al profesor Norbel por su buena acogida y gran calidad humana. Finalmente, quiero agradecer a Gonzalo por darme la oportunidad de trabajar con él, por sus enseñanzas de biología y de la vida igualmente, y por su apoyo e infinita comprensión en mi paso por el laboratorio.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Enfermedad de Chagas	3
Epidemiología	3
Etiología	4
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> y transmisión de la enfermedad	5
Cuadro clínico en humanos	7
Diagnóstico	8
Tratamiento en humanos	8
<i>Trypanosoma cruzi</i> y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	9
Modificaciones postraduccionales en histonas	10
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
1. Generar regiones codificantes de la histona H2A de <i>T. cruzi</i> con el fenotipo silvestre y con cambios en el aminoácido treonina ubicado en la posición 131 de H2A	13
1.1. Cultivo de epimastigotes y obtención de DNA genómico de <i>T. cruzi</i>	13
1.2. Amplificación y mutación de la secuencia nucleotídica codificante para H2A de <i>T. cruzi</i>	13
1.3. Purificación de los fragmentos amplificados por PCR desde geles de agarosa	14
1.4. Clonamiento de amplificadores de las secuencias codificantes para H2A- <i>wild type</i> , H2A-Thr ¹³¹ Ala, H2A-Thr ¹³¹ Glu o H2A-Thr ¹³¹ Asp en el vector de clonamiento pGEM-T <i>Easy</i>	14
2. Expresar en forma estable las histonas H2A silvestres y mutantes en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	15
2.1. Clonamiento de amplificadores de las secuencias de H2A- <i>wild type</i> , H2A-Thr ¹³¹ Ala, H2A-Thr ¹³¹ Glu o H2A-Thr ¹³¹ Asp en el vector de expresión pTREX HIS8-GFP de <i>T. cruzi</i>	15

2.2. Transfectar y seleccionar epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con los constructos pTREX-H2A- <i>wild type</i> , pTREX-H2A-Thr ¹³¹ Ala, pTREX-H2A-Thr ¹³¹ Glu o pTREX-H2A-Thr ¹³¹ Asp	17
3. Bioseguridad	18
RESULTADOS	19
1. Generar regiones codificantes de la histona H2A de <i>T. cruzi</i> con el fenotipo silvestre y con cambios en el aminoácido treonina ubicado en la posición 131 de H2A	19
2. Expresar en forma estable las histonas H2A silvestres y mutantes en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	25
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	45
Anexo Nro. 1: certificado del Comité de Bioseguridad	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	6
Figura Nro. 2: esquema del vector de expresión para <i>T. cruzi</i> pTREX-HIS8-GFP	16
Figura Nro. 3: separación electroforética de amplificadores de DNA de la secuencia codificante para la histona H2A- <i>wild type</i> utilizando DNA de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> como molde.....	19
Figura Nro. 4: detección de colonias <i>E. coli</i> positivas que presenten los fragmentos de DNA codificantes para H2A- <i>wild type</i> (A) y mutantes H2A-Thr ¹³¹ Ala (B), H2A-Thr ¹³¹ Glu (C) o H2A-Thr ¹³¹ Asp (D) insertados en el vector pGEM-T <i>Easy</i>	20
Figura Nro. 5: alineamiento de las secuencias nucleotídicas de H2A de la cepa Dm28c, secuenciadas con un partidor sentido (H2ADm28c-sent) y antisentido (H2ADm28c-antise), comparadas con la secuencia de H2A anotada en bases de datos del genoma de <i>T. cruzi</i> de la cepa CL Brener (H2ABrener).....	22
Figura Nro. 6: alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de H2A de la cepa Dm28c con la secuencia aminoacídica deducida de H2A de <i>T. cruzi</i> de la cepa CL Brener	23
Figura Nro. 7: alineamiento de las secuencias nucleotídicas de H2A mutantes con H2A- <i>wild type</i> de la cepa Dm28c.....	24
Figura Nro. 8: alineamiento de las secuencias aminoacídicas de H2A mutantes con H2A- <i>wild type</i> , de la cepa Dm28c.....	25
Figura Nro. 9: liberación de fragmentos nucleotídicos codificantes de H2A- <i>wild type</i> y mutantes de H2A mediante digestión de los constructos pGEM-H2A- <i>wild type</i> (A), pGEM-H2A-Thr ¹³¹ Ala (B), pGEM-H2A-Thr ¹³¹ Glu (C) o pGEM-H2A-Thr ¹³¹ Asp (D) con las enzimas de restricción <i>Xma</i> I y <i>Hind</i> III.....	26
Figura Nro. 10: detección de colonias <i>E. coli</i> positivas que presentan los fragmentos de DNA codificantes para H2A- <i>wild type</i> (A) y mutantes H2A-Thr ¹³¹ Ala (B), H2A-Thr ¹³¹ Glu (C) o H2A-Thr ¹³¹ Asp (D) insertados en el vector pTREX-HIS8-GFP.....	27
Figura Nro. 11: separación electroforética confirmatoria de la presencia de los insertos de histona H2A- <i>wild type</i> y mutantes en los constructos pTREX-H2A- <i>wild type</i> (A), pTREX-H2A-Thr ¹³¹ Ala (B), pTREX-H2A-Thr ¹³¹ Glu (C) o pTREX-H2A-Thr ¹³¹ Asp (D) purificados desde cultivos de las colonias de <i>E. coli</i> positivas.....	29

Figura Nro. 12: liberación de fragmentos nucleotídicos codificantes de H2A-<i>wild type</i> y mutantes de H2A mediante digestión de los constructos pTREX-H2A-<i>wild type</i> y pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (A) o pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (B) con las enzimas de restricción <i>Xma</i> I y <i>Hind</i> III.....	30
Figura Nro. 13: alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante secuenciación automática de DNA desde los constructos pTREX-H2A-<i>wild type</i> (A), pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (B), pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu (C) o pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (D) con la secuencia nucleotídica codificante para H2A-<i>wild type</i> de la cepa Dm28c (H2ADm28c).....	31
Figura Nro. 14: localización subcelular de la proteína HIS8-H2A-GFP de fenotipo silvestre y proteínas HIS8-H2A-GFP de fenotipos mutantes en epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-HIS8-GFP (control) (A) pTREX-H2A-<i>wild type</i> (B), pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (C), pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu (D) y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (E)	33
Figura Nro. 15: expresión de la proteínas HIS8-H2A-GFP de fenotipo silvestre y proteínas HIS8-H2A-GFP de fenotipos mutantes en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de la cepa Dm28c transfectados.....	35

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, un protozoo hemoflagelado, es el agente causal de la enfermedad de Chagas, patología endémica de Latinoamérica que se ha extendido al resto del mundo. Este parásito presenta un ciclo de vida indirecto y se transmite principalmente mediante insectos hematófagos triatominos a distintos hospederos mamíferos, incluyendo el ser humano. Dentro de los mecanismos no vectoriales de transmisión de la enfermedad, los más importantes son la transfusión sanguínea y la infección transplacentaria. La enfermedad cursa en tres fases progresivas: aguda, indeterminada y crónica, pudiendo causar discapacidad e incluso la muerte. Las drogas utilizadas como tratamiento de esta patología son poco eficaces en el tratamiento de la fase crónica, además de generar numerosos efectos colaterales indeseados, siendo necesario desarrollar nuevas drogas más eficientes en la eliminación del parásito y más inocuas para el paciente.

Para que se establezca una infección crónica, *T. cruzi* debe resistir el daño oxidativo al DNA generado por las células del hospedero. La sobrevivencia de los parásitos se relacionaría con la capacidad de reparación del DNA, donde en el caso de mamíferos la fosforilación de la histona H2AX en el residuo Ser¹³⁹ sería fundamental. En tripanosomátidos no se han identificado genes ortólogos para H2AX, pero en *T. brucei* se detectó que la histona H2A canónica es fosforilada en el residuo Thr¹³⁰ como consecuencia de daño al DNA, residuo que se conserva en otros tripanosomátidos y que en el caso de *T. cruzi* corresponde a Thr¹³¹. La participación de este último en la respuesta al daño del DNA aún no se ha comprobado.

Se realizaron tres mutaciones sitio-dirigidas diferentes en la secuencia nucleotídica que codifica para el residuo Thr¹³¹ de H2A de *T. cruzi*, reemplazándolo por alanina (incapaz de ser fosforilada), ácido glutámico y ácido aspártico (que simulan una fosforilación permanente del sitio). Las secuencias nucleotídicas silvestres y mutantes fueron insertadas en el vector pTREX-HIS8-GFP y expresadas como proteínas de fusión con GFP en epimastigotes de *T. cruzi*.

Se comprobó la expresión exitosa de las proteínas en *T. cruzi* mediante visualización directa por microscopía de fluorescencia, inmunofluorescencia y mediante ensayos de

Western blot. Las histonas marcadas con GFP se localizan a nivel de núcleo, lo cual sugiere una asociación con la cromatina del parásito, debiendo confirmarse su incorporación efectiva al nucleosoma mediante estudios posteriores. Otra tarea a futuro consiste en determinar si efectivamente el residuo Thr¹³¹ de H2A de *T. cruzi* se fosforila como respuesta al daño del DNA.

Los resultados permiten concluir que es posible generar líneas de epimastigotes de *T. cruzi* que expresen de manera estable la histona H2A tanto de fenotipo silvestre como de fenotipos mutantes para el residuo Thr¹³¹, utilizando el vector pTREX-HIS8-GFP. Los epimastigotes que expresan estas proteínas se encuentran disponibles para realizar ensayos de viabilidad comparativa frente a la exposición con agentes genotóxicos, lo que podría determinar un posible nuevo blanco terapéutico para la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, histona, H2A, daño oxidativo, reparación del DNA

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, a hemoflagellated protozoan, is the etiological agent of Chagas disease, which is endemic in Latin America and has spread to the rest of the world. This parasite has an indirect life cycle and is transmitted to mammalian hosts, including human, mainly by triatomine bloodsucking insects. Blood transfusion and vertical transmission from mother to infant are the most important among the non-vectorial mechanisms of transmission. The disease occurs in three progressive phases: acute, indeterminate and chronic phase and it can cause disability and even death. The drugs used for treating the disease are not effective when used in the chronic phase, and they also produce several adverse effects, therefore it is necessary to develop new drugs more effective and better tolerated by patients.

For a chronic infection to be established, *T. cruzi* must resist the oxidative damage to its DNA generated by host cells. Survival may be achieved through parasite DNA repair. In mammals, histone H2A phosphorylation at Ser¹³⁹ is key for DNA repair. No H2AX orthologous genes have been identified in trypanosomatids, however, canonical H2A in *T. brucei* is phosphorylated at Thr¹³⁰ as a response to DNA damage. This Thr residue is conserved among other trypanosomatids, and in *T. cruzi* it is localized at the position 131. The participation of Thr¹³¹ of *T. cruzi* in response to DNA damage has not been proven yet.

Three different site-directed mutations were carried out in the nucleotide sequence that codes for H2A Thr¹³¹ residue of *T. cruzi*, being replaced for alanine (which cannot be phosphorylated), glutamic acid and aspartic acid (both of them simulating a phosphorylated site). The wild type and mutant nucleotide sequences were inserted in pTREX-HIS8-GFP vector and expressed as GFP fusion proteins in *T. cruzi* epimastigotes.

Successful expression of the proteins in the parasite was checked by direct visualization with fluorescence microscopy, immunofluorescence and by Western blot assays. GFP-tagged histones are localized in the nucleus, which suggests an association with the chromatin of parasites. Further studies are needed to confirm that the histones are incorporated in the nucleosomes. It also has to be proven whether the H2A Thr¹³¹ of *T. cruzi* is indeed phosphorylated as a response to DNA damage.

Results allow concluding that it is possible to generate epimastigote lines of *T. cruzi* stably expressing H2A with both wild type and mutant phenotypes for Thr¹³¹, using pTREX-HIS8-GFP vector. Epimastigotes that express these proteins are available for assays of comparative viability in the presence of genotoxic agents, which could determine a possible new therapeutic target for Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, histone, H2A, oxidative damage, DNA repair

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud pública en Latinoamérica que en la actualidad se ha extendido al resto del mundo. El agente causal es *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoario hemoflagelado, que presenta un ciclo de vida indirecto, infectando tanto hospederos mamíferos como insectos vectores triatominos. Durante su ciclo de vida, el parásito presenta tres formas celulares: epimastigote (forma extracelular replicativa y no infectiva), presente en insectos vectores; tripomastigote (forma extracelular no replicativa e infectiva), que se encuentra tanto en vectores triatominos (tripomastigote metacíclico) como en hospederos mamíferos (tripomastigote sanguíneo); y amastigote (forma intracelular replicativa), presente en hospederos mamíferos.

En todas sus formas celulares, *T. cruzi* se ve expuesto a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) que pueden generar daño oxidativo en el DNA parasitario. En mamíferos se ha observado que una de las primeras respuestas frente al daño del DNA es la modificación postraduccional de la histona H2AX, la cual es fosforilada en el residuo Ser¹³⁹. Dicha modificación juega un rol importante en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis, siendo fundamental para resistir el daño al DNA. Las histonas son proteínas altamente conservadas en eucariontes, sin embargo en tripanosomátidos el grado de conservación es bajo. A pesar de que en estos organismos no se han identificado genes ortólogos para la histona H2AX, indagaciones recientes realizadas en *Trypanosoma brucei* han detectado que la histona H2A canónica es fosforilada en el residuo Thr¹³⁰ como consecuencia de daño al DNA.

Analizando el genoma de *T. cruzi* se determinó que la treonina fosforilable en *T. brucei* frente a daño en el DNA es conservada, correspondiendo en *T. cruzi* al residuo Thr¹³¹. Sin embargo, no se ha comprobado su participación en la respuesta al daño del DNA. En esta memoria de título se realizaron tres mutaciones sitio-dirigidas diferentes en la secuencia nucleotídica que codifica para el residuo Thr¹³¹ de H2A de *T. cruzi*. La primera de ellas permitió modificar Thr¹³¹ por alanina, residuo incapaz de ser fosforilado, y las otras dos por residuos de ácido glutámico y ácido aspártico, que simulan una fosforilación permanente del sitio. Tanto las secuencias nucleotídicas silvestres como las mutantes para H2A fueron

expresadas como proteínas de fusión con proteína fluorescente verde (GFP) en epimastigotes de *T. cruzi*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una zoonosis cuyo agente causal es el protozoo hemoflagelado *T. cruzi*. Esta patología, descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, se encuentra presente en América desde hace más de 9.000 años, incluyendo Chile, donde ha sido documentada en comunidades prehistóricas del norte del país (Apt *et al.*, 2008).

Su importancia en salud pública radica en que se trata de una patología oportunista en individuos inmunodeprimidos y crónica en inmunocompetentes, pudiendo provocar discapacidad y muerte (Fuentes, 2012). Corresponde a la enfermedad parasitaria que más muertes genera en el continente americano (Guerra-Guttenberg *et al.*, 2008).

Epidemiología

1. Situación internacional

La infección con *T. cruzi* en América abarca desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile, área donde existen los vectores biológicos del parásito (Apt *et al.*, 2008). Históricamente la transmisión y morbilidad se concentraba en esta zona, pero la enfermedad se ha extendido hacia otras regiones del globo debido a la migración de individuos crónicamente infectados tanto dentro como fuera de Latinoamérica, transformándose la enfermedad de Chagas en un problema de salud pública de carácter mundial (Rassi *et al.*, 2012).

Según estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), existirían a nivel mundial entre 7,7 y 10 millones de personas con infección crónica por *T. cruzi*, y anualmente se producirían entre 10.000 y 14.000 muertes debido a la tripanosomiasis americana. Estas cifras son sustancialmente inferiores a las de unas décadas atrás, debido al desarrollo de programas que incluyen control del vector biológico, tamizaje de sangre y educación de la población en riesgo. Dentro de estos programas destaca el desarrollado a partir de 1991 en los países del Cono Sur. A fines de la década de 1990, Uruguay y Chile fueron certificados como

países libres de la transmisión por el vector domiciliario *Triatoma infestans* (Rassi *et al.*, 2012).

De los individuos infectados, se estima que más de 300.000 habitan en Estados Unidos, más de 5.500 en Canadá, más de 80.000 en Europa y Región del Pacífico Occidental, más de 3.000 en Japón y más de 1.500 en Australia (Coura y Viñas, 2010).

En América, la población en riesgo estimada es de 80 a 100 millones de personas (Apt *et al.*, 2008). Los países con mayor prevalencia de la enfermedad de Chagas son Bolivia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%) y Paraguay (2,5%). Casi el 60% de las personas infectadas con *T. cruzi* habita en Argentina, Brasil y México, a pesar de que estos dos últimos presentan una prevalencia cercana a 1% (Rassi *et al.*, 2012).

2. Situación nacional

En Chile el área endémica de la enfermedad se extiende desde la Región de Arica-Parinacota hasta la Región del Libertador Bernardo O'Higgins (Apt *et al.*, 2008). En esta zona vive el 77% de la población del país. Sin embargo, debido a que la enfermedad es más frecuente en áreas rurales y periurbanas, a que la transmisión vectorial está interrumpida, y a que se realiza control de la transmisión transfusional en los bancos de sangre, la población infectada en Chile ha disminuido considerablemente, estimándose actualmente en alrededor de 98.000 personas (Fuentes, 2012).

De acuerdo a la información recopilada por la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010, un 0,7% de la población chilena está infectado con *T. cruzi*. La prevalencia de la tripanosomiasis americana es de 1,5% en zonas rurales y 0,6% en regiones urbanas. La región con mayor prevalencia es la Región de Atacama, con un 4,7%, valor significativamente superior al de las demás regiones del país (Ministerio de Salud, 2010).

Etiología

Trypanosoma cruzi es un parásito perteneciente al filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Al igual que las demás especies de su familia, se caracteriza por poseer un flagelo y una gran mitocondria, la cual contiene el kinetoplasto. Este último consiste en una red de DNA, correspondiente al

genoma mitocondrial del parásito, y se ubica cerca del cuerpo basal del flagelo (Rassi *et al.*, 2012).

Se han descrito dos linajes para *T. cruzi*: Tc1 y Tc2. El primero se asocia con el ciclo silvestre del parásito, con casos humanos en el altiplano chileno-boliviano y con algunos casos en Venezuela, mientras que al segundo se le otorga mayor importancia por asociarse al ciclo doméstico, y se divide en cinco sub-grupos: a, b, c, d y e. Si bien el primer linaje tendría una menor resistencia a drogas tripanocidas en comparación con el segundo, no se ha establecido una correlación evidente entre la severidad del cuadro y el linaje parasitario (Rassi *et al.*, 2010).

Ciclo de vida de *T. cruzi* y transmisión de la enfermedad

Trypanosoma cruzi presenta un ciclo de vida indirecto y se transmite principalmente a través de insectos hematófagos triatominos. Dentro de los hospederos mamíferos se encuentra el ser humano y más de 150 especies de animales domésticos y silvestres. Existirían alrededor de 140 especies de triatominos, conocidos vulgarmente como vinchucas, pero solo algunos de ellos son vectores competentes capaces de transmitir al parásito. Los principales vectores triatominos conocidos son: *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* en países del Cono Sur, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países de la Comunidad Andina y partes de Centroamérica, y *T. dimidiata* y *Triatoma barberi* en México (Rassi *et al.*, 2012). En Chile, se ha descrito la presencia de tres especies vectores de la enfermedad: *T. infestans* (vector doméstico) y *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* (vectores silvestres) (Apt *et al.*, 2008). Recientemente se describió la presencia de una cuarta especie de vinchuca en el país, *Mepraia parapatraca*, desconociéndose aún si es también un vector del parásito (Jercic *et al.*, 2012).

El ciclo de vida del parásito (figura Nro. 1) se inicia cuando un insecto triatomino libre del agente se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, la cual contiene tripomastigotes sanguíneos. Al llegar al intestino anterior del insecto, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, los que proliferan y se desplazan hacia el tracto digestivo posterior, donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Cuando el triatomino se

alimenta de la sangre de otro hospedero mamífero, elimina al mismo tiempo sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos. El ingreso del parásito al tejido subcutáneo y vasos sanguíneos del mamífero es facilitado por el rascado y las enzimas proteolíticas contenidas en la saliva del triatomino. Posteriormente, los tripomastigotes ingresan al citoplasma de las células del hospedero, principalmente macrófagos y otros leucocitos. En el citoplasma los parásitos se diferencian a amastigotes, los que proliferan y luego se diferencian nuevamente a tripomastigotes. Estos últimos, mediante citólisis, son liberados al torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguíneos), infectando diversos tejidos como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y células de la glia del sistema nervioso central. El ciclo se cierra cuando un nuevo vector triatomino libre de la infección se alimenta de sangre del hospedero mamífero infectado (Tyler y Engman, 2001).

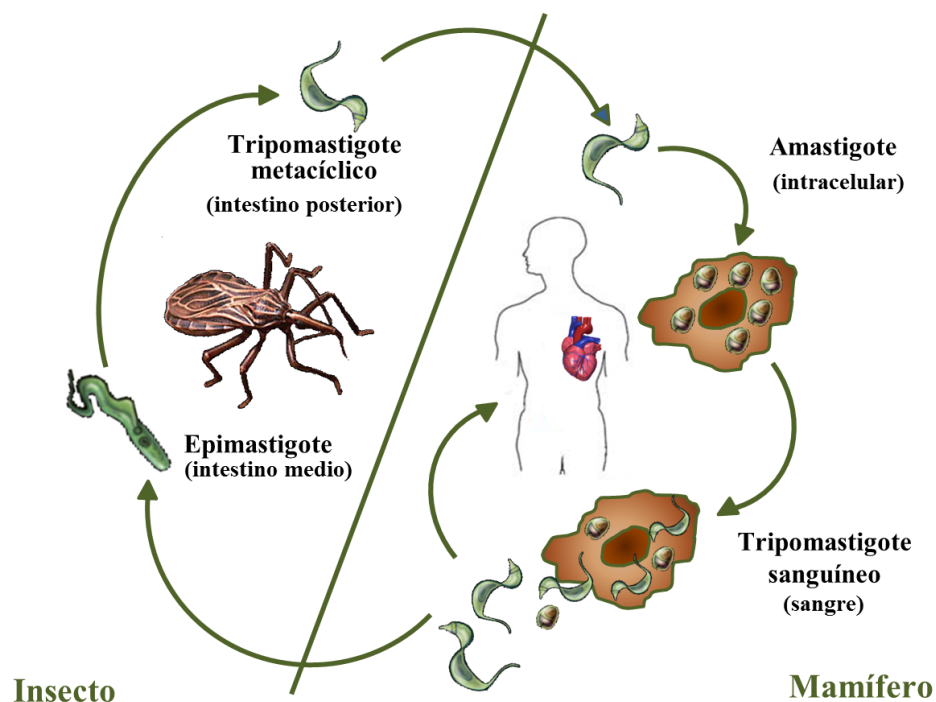


Figura Nro. 1: ciclo de vida de *T. cruzi*. Formas celulares del parásito presentes tanto en el hospedero mamífero como en el insecto vector triatomino (adaptado de Vázquez, 2007).

Además, existen mecanismos no vectoriales de transmisión de la enfermedad, siendo la transfusión sanguínea y la infección transplacentaria las causas más importantes de transmisión del parásito en regiones no endémicas. Otros mecanismos corresponden a trasplantes de órganos a partir de un donante con infección crónica, transmisión oral por alimentos o líquidos contaminados con el parásito y, con menor frecuencia, accidentes de laboratorio (Rassi *et al.*, 2012).

Cuadro clínico en humanos

La enfermedad cursa en tres fases progresivas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda es generalmente asintomática y solo en el 5% de los casos se presentan signos muy variables como fiebre, dolor de cabeza, anorexia, malestar, mialgia, dolor en las articulaciones, debilidad, náuseas, vómitos, diarrea, hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía generalizada o localizada. En ocasiones se presenta edema, generalizado o localizado, en el rostro o en las extremidades inferiores. Es posible observar un endurecimiento localizado indoloro (chagoma) en el sitio de inoculación del parásito y, si este ingresa por las mucosas oculares, se puede producir el signo de Romaña. Dicho signo corresponde a un edema bpalpebral indoloro generalmente unilateral, a menudo acompañado de conjuntivitis y de un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos locales. Los signos suelen mejorar sin tratamiento en semanas o meses; sin embargo, algunos cuadros agudos pueden ser mortales, especialmente en niños y en pacientes inmunodeprimidos, desarrollándose miocarditis aguda o meningoencefalitis. La fase indeterminada es un período asintomático que sigue a la fase aguda. Entre el 10 a 30% de los pacientes ingresa a la fase crónica después de años, la cual se caracteriza por alteraciones orgánicas, siendo la cardiopatía la forma crónica más frecuente, con arritmias y anomalías en la conducción, insuficiencia cardíaca, aneurismas apicales, embolias y muerte súbita (The Center of Food Security and Health, 2009). La cardiomiopatía chagásica crónica es la manifestación más seria de la enfermedad de Chagas, y corresponde al tipo de miocarditis crónica más común a nivel mundial. Al compartir características clínicas con la cardiomiopatía dilatada “clásica”, muchas veces es mal diagnosticada (Guerra-Guttenberg, 2008). También pueden producirse cuadros de megaesófago o megacolon, con complicaciones como neumonía por aspiración, pérdida de peso, ruptura de esófago,

obstrucción intestinal, vólvulos, fecalomas, úlceras o perforación intestinal con peritonitis, entre otras (The Center of Food Security and Health, 2009).

Diagnóstico

El método diagnóstico de elección depende de la fase de la enfermedad en que se encuentre el paciente. Así, el diagnóstico de la infección aguda se basa en la detección del parásito a través de la observación microscópica directa de los tripomastigotes en frotis de sangre fresca no coagulada o de la capa leucocitaria del microhematocrito del paciente. Los parásitos también pueden observarse en frotis sanguíneos utilizando tinción Giemsa. En la fase crónica de la enfermedad se utilizan métodos serológicos basados en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito (inmunoglobulina G) en la sangre del paciente. Para estos efectos, las técnicas más comúnmente utilizadas son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta. Para un diagnóstico definitivo, se recomienda que existan resultados positivos de al menos dos de estos tres ensayos. La técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) para detectar el DNA del parásito en la sangre del paciente no se considera como un método diagnóstico de rutina, pero puede utilizarse para confirmar el diagnóstico en casos donde los métodos serológicos sean poco concluyentes (Rassi *et al.*, 2012).

Tratamiento en humanos

El objetivo del tratamiento utilizado actualmente es curar la infección en la fase aguda de la enfermedad, prevenir alteraciones orgánicas en la fase asintomática, limitar la discapacidad y prevenir la morbilidad y mortalidad una vez que se manifiesta la fase crónica de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2012).

Se recomiendan dos drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, correspondiendo ambas a compuestos nitroheterocíclicos: nifurtimox y benznidazol. El segundo ha sido más ampliamente estudiado y es más seguro y eficaz, siendo por lo tanto el tratamiento de primera opción (Rassi *et al.*, 2012). Sin embargo, en Chile solamente se encuentra disponible nifurtimox (Fuentes, 2012).

Tanto nifurtimox como benznidazol están contraindicados durante la gestación y en pacientes con insuficiencia renal o hepática. Tampoco deben ser administrados en individuos que padezcan cardiomiopatía chagásica avanzada o megaesófago con dificultad significativa para tragar (Rassi *et al.*, 2012).

Ambos fármacos tienen el defecto de ser poco eficaces en el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad, además de generar numerosos efectos colaterales indeseados. Esto último evidencia la necesidad de desarrollar nuevas drogas más eficientes en la eliminación del parásito, y más inocuas para el paciente (Urbina y Docampo, 2003).

***Trypanosoma cruzi* y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno**

Todas las formas celulares de *T. cruzi* se encuentran expuestas a especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o especies reactivas de nitrógeno (RNS). Por una parte, dentro del intestino del insecto vector triatomino, los epimastigotes se enfrentan a moléculas resultantes de la degradación del grupo hemo, que en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generan altos niveles de radicales hidroxilo (OH⁻) (Graça-Souza *et al.*, 2006). Por otra parte, en el comienzo de la infección parasitaria, los tripomastigotes metacíclicos se enfrentan a la primera línea de defensa del sistema inmune innato de mamíferos: los macrófagos. Los tripomastigotes ingresan a los macrófagos mediante la formación de una vacuola parasitófora, dentro de la cual se exponen a la producción de ROS (Hogg *et al.*, 1992) y RNS (Cummings y Tarleton., 2004). Sin embargo, estos mecanismos de defensa no son capaces de eliminar por completo al parásito, y es así como se establecen las fases indeterminada y crónica de la enfermedad en el hospedero vertebrado (Piacenza *et al.*, 2009). Finalmente, los cardiomiocitos infectados crónicamente con *T. cruzi* presentan un estado de estrés oxidativo permanente que afectaría a la forma amastigote. Este estrés es atribuible a dos procesos: el importante grado de infiltrado inflamatorio en el miocardio y la disfunción mitocondrial que afecta a los cardiomiocitos parasitados (Zacks *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2009).

Si bien todas las macromoléculas celulares están sujetas a daño por ROS/RNS, las consecuencias deletéreas primarias del estrés oxidativo probablemente se relacionan con el daño al DNA (Riley, 1994). Tanto células procariontes como eucariontes se encuentran

constantemente expuestas a agentes oxidantes endógenos y exógenos que inducen daño en el DNA, generando lesiones de bases, formación de sitios abásicos y quiebres de hebras simples y dobles, entre otras (Hazra *et al.*, 2007). Estas alteraciones son rápidamente detectadas por la célula, poniéndose en marcha una serie de mecanismos destinados a detener el ciclo celular y reparar el DNA dañado. Sin embargo, si el nivel de daño sobrepasa estos mecanismos de reparación, se produce la muerte celular programada (Barzilai y Yamamoto, 2004; Hazra *et al.*, 2007).

De esta manera, para que se establezca una infección crónica, *T. cruzi* debe resistir el daño oxidativo al DNA generado por las células del hospedero. Los mecanismos que conducen a la reparación del daño oxidativo en el DNA de *T. cruzi* son poco conocidos. No obstante, se ha probado la presencia de la vía de reparación del DNA por escisión de bases (BER) en este parásito (Cabrera *et al.*, 2011; Sepúlveda *et al.*, 2014).

Modificaciones postraduccionales en histonas

El DNA se organiza en forma de cromatina, cuya unidad fundamental corresponde al nucleosoma. Este consta de 146 pares de bases de DNA que envuelven un octámero proteico que contiene dos unidades de cada una de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Se ha descrito un gran número de modificaciones postraduccionales en histonas como acetilaciones, metilaciones, ubiquitinaciones y fosforilaciones (Mandava *et al.*, 2007). En una gran variedad de sistemas biológicos se ha evidenciado un rol regulatorio importante de estas modificaciones en procesos celulares como modificación de la expresión génica, recombinación y respuesta al daño del DNA. La fosforilación de la histona H2AX en el residuo Ser¹³⁹ es una de las respuestas tempranas más importantes frente al daño del DNA en mamíferos. Esta histona, altamente conservada en eucariontes, es una variante de la histona H2A. H2AX difiere de H2A y de otras variantes humanas de H2A en la región carboxilo-terminal, la cual es más extensa en H2AX; además, presenta un motivo SQE fosforilable (Rios-Doria *et al.*, 2009).

En un trabajo reciente se observaron los efectos de la expresión ectópica de la histona H2AX fusionada a GFP, tanto de fenotipo silvestre como de fenotipos mutantes para el sitio de fosforilación previamente mencionado. La expresión de H2AX con la mutación

Ser¹³⁹Ala, incapaz de ser fosforilada (Luciano *et al.*, 2004), suprimió parcialmente el arresto temprano en G2/M frente a radiación ionizante, además de generar una mayor sensibilidad frente al daño del DNA (Rios-Doria *et al.*, 2009). La expresión de H2AX con la mutación Ser¹³⁹Glu, que simula una fosforilación permanente del sitio (Luciano *et al.*, 2004), indujo una disminución del número de células en mitosis en ausencia de daño del DNA (Rios-Doria *et al.*, 2009).

Drosophila melanogaster, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y organismos del género *Entamoeba*, *Giardia*, *Trichomonas*, *Toxoplasma* y *Plasmodium*, expresan ortólogos de la histona H2AX, la cual conserva el residuo de serina en la región carboxilo-terminal (motivo SQ) fosforilable (Glover y Horn, 2012). Si bien las histonas son extremadamente conservadas entre eucariontes, desde levaduras a humanos, son muy divergentes en tripanosomátidos (Janzen *et al.*, 2006). A pesar de que en estos organismos no se han identificado genes ortólogos para la histona H2AX, indagaciones recientes realizadas en *T. brucei* han detectado que la histona H2A canónica es fosforilada en el residuo Thr¹³⁰ como consecuencia de daño al DNA. Este residuo de treonina se conserva en otros tripanosomátidos como *T. cruzi* y especies del género *Leishmania*, y en el caso de *T. cruzi* corresponde al residuo Thr¹³¹ (Glover y Horn, 2012). Sin embargo, aún no se ha comprobado su participación en la respuesta al daño del DNA.

Con el objetivo de determinar la importancia de la histona H2A en la reparación del DNA de *T. cruzi*, en particular del residuo Thr¹³¹ de la proteína, se modificó dicho aminoácido por un residuo no fosforilable, alanina, y por los residuos ácido glutámico y ácido aspártico, que simulan una fosforilación permanente del sitio (Luciano *et al.*, 2004). La generación de epimastigotes que expresen las distintas histonas H2A modificadas permitirá a futuro investigar respecto al rol de esta proteína en la resistencia de *T. cruzi* al daño oxidativo y evaluar su potencial como posible blanco terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Generar líneas de epimastigotes de *T. cruzi* que expresen la histona H2A-GFP de fenotipo silvestre, así como una mutante no fosforilable y mutantes que simulen fosforilación permanente del residuo Thr¹³¹.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar regiones codificantes de la histona H2A de *T. cruzi* con el fenotipo silvestre y con cambios en el aminoácido treonina ubicado en la posición 131 de H2A.
2. Expresar en forma estable las histonas H2A silvestres y mutantes en epimastigotes de *T. cruzi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Generar regiones codificantes de la histona H2A de *T. cruzi* con el fenotipo silvestre y con cambios en el aminoácido treonina ubicado en la posición 131 de H2A

1.1. Cultivo de epimastigotes y obtención de DNA genómico de *T. cruzi*

El cultivo de epimastigotes, forma no infectiva de *T. cruzi* (cepa Dm28c), se realizó en medio *Diamond* suplementado con 10% de suero fetal bovino, hemina 75 μ M y antibióticos (penicilina 75 U/ml y estreptomicina 75 μ g/ml), mantenido 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 fluorometría utilizando el kit *Quant-iT™ dsDNA HS Assay* (Invitrogen).

1.2. Amplificación y mutación de la secuencia nucleotídica codificante para H2A de *T. cruzi*

Para amplificar la secuencia silvestre (*wild type*) o realizar la mutación sitio-dirigida de la secuencia de DNA codificante para la histona H2A (405 pb) se empleó la técnica de PCR utilizando DNA genómico de *T. cruzi* como DNA molde. Se diseñaron un partidador sentido y distintos partidores antisentidos basándose en la secuencia presente en bases de datos de Internet NCBI (*GenBank*, *Pubmed*, *US National Library of Medicine National Institutes of Health*) para H2A de *T. cruzi* de la cepa CL Brener (*GenBank accession XM_814269*), reemplazando o no los nucleótidos que codificarían para Thr¹³¹ por otros que codificaran para alanina, ácido glutámico y ácido aspártico (marcados con naranja). Los partidores diseñados incluían fragmentos nucleotídicos con sitios de corte para las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III (marcados con verde y azul, respectivamente).

Partidores para la secuencia codificante de H2A-*wild type*:

H2A FORW (sentido): TCCCCCGGGATGGCAACCCCGAAGCAGG (*Xma* I)

H2A BACK (antisentido): CCCAAGCTTAGCGCTGGGCGTCGCC (*Hind* III)

Partidores para la secuencia codificante de H2A que generan la modificación Thr¹³¹Ala:

H2A FORW (sentido): TCCC**CCCGGG**ATGGCAACCCCGAAGCAGG (*Xma* I)

H2A BACK ALA (antisentido): CCC**AAGCTT**AGCGCTGGGCG**CCGCCC** (*Hind* III)

Partidores para la secuencia codificante de H2A que generan la modificación Thr¹³¹Glu:

H2A FORW (sentido): TCCC**CCCGGG**ATGGCAACCCCGAAGCAGG (*Xma* I)

H2A BACK GLU (antisentido): CCC**AAGCTT**AGCGCTGGGCT**TCCGCCC** (*Hind* III)

Partidores para la secuencia codificante de H2A que generan la modificación Thr¹³¹Asp:

H2A FORW (sentido): TCCC**CCCGGG**ATGGCAACCCCGAAGCAGG (*Xma* I)

H2A BACK ASP (antisentido): CCC**AAGCTT**AGCGCTGGG**GTCGCCC** (*Hind* III)

Los ensayos de PCR fueron efectuados utilizando el siguiente protocolo: 1X de 5X *Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega), 0,2 mM de dNTP, 16 de pM de cada partidor, 3 mM de MgCl₂ (Promega), 1,5 U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega) y 160 ng de DNA, en un volumen final de 25 µL. Los ciclos termales utilizados fueron: 5 min de denaturación a 95°C, seguidos de 20 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 59°C y 40 s a 72°C. Posteriormente, se aplicaron 20 ciclos de 30 s a 95°C y 40 s a 72°C. La extensión final fue de 3 min a 72°C.

La visualización de los fragmentos génicos amplificados se realizó en geles de agarosa 0,8% p/v en tampón Tris-acetato-EDTA (TBE) pH 8,3, teñidos con *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain*.

1.3. Purificación de los fragmentos amplificados por PCR desde geles de agarosa

Los fragmentos amplificados de DNA codificantes para H2A-*wild type*, H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu y H2A-Thr¹³¹Asp fueron purificados desde geles de agarosa con el *kit SV Gel and PCR Clean-Up System®* (Promega), según las instrucciones del fabricante.

1.4. Clonamiento de amplificados de las secuencias codificantes para H2A-*wild type*, H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu o H2A-Thr¹³¹Asp en el vector de clonamiento pGEM-T *Easy*

Los fragmentos purificados de DNA codificante para H2A-*wild type*, H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu o H2A-Thr¹³¹Asp fueron ligados en el vector de clonamiento para bacterias

pGEM-T *Easy* (Promega), según el protocolo del fabricante. Se transformaron bacterias *E. coli* cepa JM109 quimiocompetentes con los constructos obtenidos, mediante *shock térmico*, y 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 ampicilina, colorimetría y la técnica de PCR de colonias. Para la PCR de colonias se empleó el protocolo mencionado anteriormente, en un volumen total de 12,5 µL. Se seleccionó una colonia bacteriana positiva para cada uno de los constructos: pGEM-H2A-*wild type*, pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala, pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu o pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp, los cuales fueron purificados desde cultivos de bacterias transformadas utilizando el *kit QIAprep Spin Miniprep*[®] (QIAGEN), según instrucciones del fabricante, y luego se sometieron a secuenciación automática de DNA.

2. Expresar en forma estable las histonas H2A silvestres y mutantes en epimastigotes de *T. cruzi*

2.1. Clonamiento de amplificadas de las secuencias de H2A-*wild type*, H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu o H2A-Thr¹³¹Asp en el vector de expresión pTREX-HIS8-GFP de *T. cruzi*

Se utilizó el vector de expresión pTREX-HIS8-GFP de *T. cruzi*, que genera una proteína de fusión con 8 residuos de histidinas en la región amino y la proteína fluorescente verde GFP en la región carboxilo de la proteína de interés. Además, dicho vector posee un gen de resistencia a ampicilina y un gen de resistencia a neomicina (figura Nro. 2).

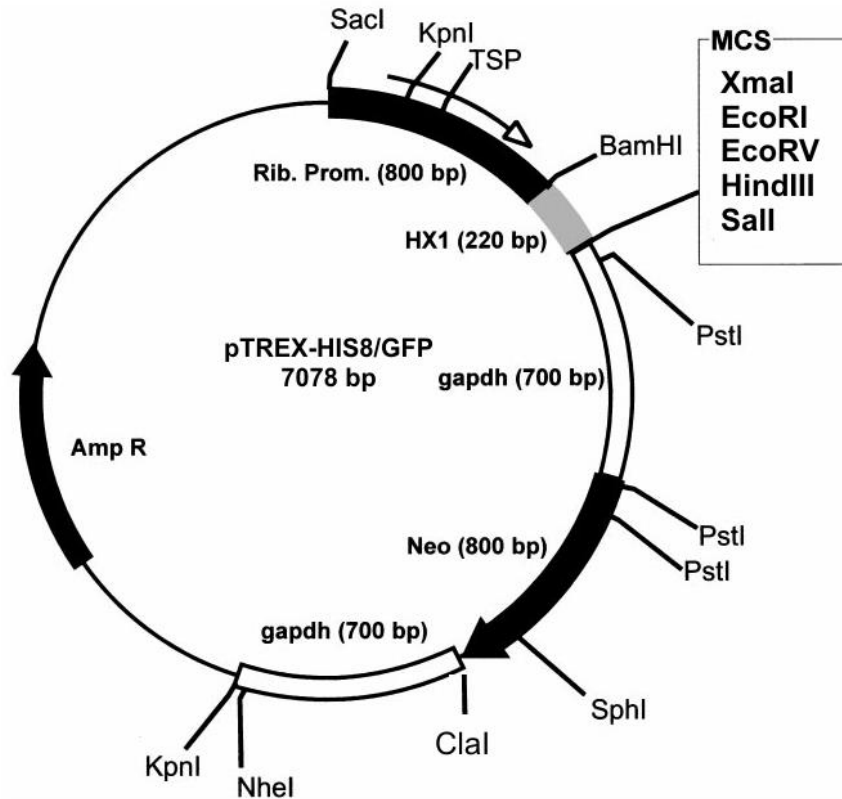


Figura Nro. 2: esquema del vector de expresión para *T. cruzi* pTREX-HIS8-GFP. El constructo presenta un gen de resistencia a ampicilina (Amp R), uno de resistencia a neomicina (Neo) y sitios de corte para diversas enzimas de restricción (*Xma* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Sa* II).

Los constructos pGEM-H2A-*wild type*, pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala, pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu y pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp fueron digeridos con las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III, y visualizados en geles de agarosa 0,8% p/v en tampón TBE pH 8,3, teñidos con *GelRed*TM *Nucleic Acid Gel Stain*. Los fragmentos génicos liberados como consecuencia del corte con las enzimas fueron purificados con el kit *SV Gel and PCR Clean-Up System*[®] (Promega) y ligados en el vector pTREX-HIS8-GFP, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Los constructos obtenidos fueron electroporados en bacterias *E. coli* cepa JM109, que posteriormente fueron cultivadas en placas Petri con medio LB agar-ampicilina. La selección de clones positivos se realizó mediante ampicilina y la técnica de PCR de colonias, utilizando los partidores y el protocolo descritos anteriormente, en un

volumen final de 12,5 μ L. Se seleccionó una colonia bacteriana positiva y cada uno de los constructos (pTREX-H2A-*wild type*, pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala, pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp) fueron purificados utilizando el *kit QIAprep Spin Miniprep*[®] (QIAGEN), según instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó una amplificación confirmatoria mediante PCR de la secuencia codificante para H2A silvestre o mutada, utilizando los constructos purificados como DNA molde. Por otra parte, estos constructos fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III con el objetivo de visualizar la liberación de los fragmentos insertados. Tanto los fragmentos de DNA amplificados como los fragmentos de DNA liberados fueron visualizados en geles de agarosa 0,8% p/v en tampón TBE pH 8,3, teñidos con *GelRed*[™] *Nucleic Acid Gel Stain*. Una vez confirmada la amplificación y liberación de los fragmentos correspondientes, los constructos purificados fueron sometidos a secuenciación automática de DNA.

2.2. Transfectar y seleccionar epimastigotes de *T. cruzi* con los constructos pTREX-H2A-*wild type*, pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala, pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu o pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp

Epimastigotes de la cepa Dm28c fueron electroporados con los plasmidios pTREX-H2A-*wild type*, pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala, pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu o pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp, generados previamente. Para tales propósitos, los parásitos se contaron en cámara de Neubauer y se lavaron una vez en tampón fosfato salino (PBS) estéril. Luego fueron resuspendidos en medio de electroporación (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,6) a una concentración de 1x10⁸ parásitos/mL. Posteriormente se tomaron 400 μ L de epimastigotes resuspendidos y se incubaron con 50-100 μ g de cada constructo. Se electroporó a 0,3 kV y 500 μ F en dos pulsos, separados por un intervalo de 10 s en hielo. Inmediatamente, los parásitos fueron transferidos a medio LIT suplementado con 20% suero fetal bovino (SFB) e incubados durante 48 h a 28°C. Posteriormente se adicionaron 250 μ g/mL del antibiótico G418, análogo de sulfato de neomicina, para seleccionar los parásitos que insertaron el vector en su genoma. Esta concentración de antibiótico fue mantenida hasta la segunda semana y posteriormente se aumentó a 500 μ g/mL.

La comprobación de la expresión de cada proteína se realizó mediante visualización directa por microscopía de fluorescencia, inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario

monoclonal anti-GFP de ratón y anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados al fluoróforo Alexa 488 y, finalmente, mediante ensayos de *Western blot* sobre homogeneizados de proteínas totales de los parásitos transfectados, 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.

3. Bioseguridad

Los experimentos previamente descritos fueron realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile, bajo las normas establecidas por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (anexo Nro. 1).

RESULTADOS

1. Generar regiones codificantes de la histona H2A de *T. cruzi* con el fenotipo silvestre y con cambios en el aminoácido treonina ubicado en la posición 131 de H2A

En primer lugar se procedió a amplificar la secuencia nucleotídica codificante para la histona H2A-*wild type* mediante la técnica de PCR con partidores específicos, utilizando como molde DNA total aislado desde epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c mantenidos en cultivo. En la figura Nro. 3 se muestra la separación electroforética de los amplificadores del gen codificante para la histona H2A de *T. cruzi* en un gel de agarosa 0,8% p/v en TBE 1X pH 8,3, teñido con *GelRed*TM *Nucleic Acid Gel Stain*. La presencia de amplificadores cercanos a 400 pb (carriles 4 al 6) concuerda con el tamaño esperado para el gen codificante de H2A-*wild type* (405 pb) de *T. cruzi*.

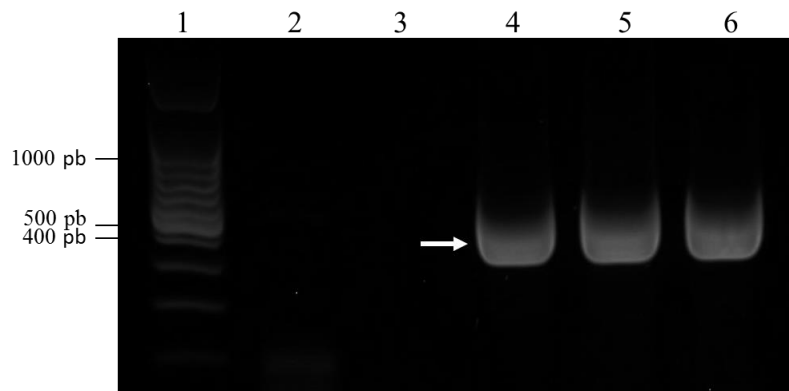


Figura Nro. 3: separación electroforética de amplificadores de DNA de la secuencia codificante para la histona H2A-*wild type* utilizando DNA de epimastigotes de *T. cruzi* como molde. Carril 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega); carril 2: control negativo de la técnica de PCR para H2A-*wild type*, sin DNA molde; carriles 4 al 6: amplificadores de la secuencia nucleotídica codificante de H2A de *T. cruzi*, tamaño esperado del amplificador de 405 pb (flecha).

Utilizando el mismo procedimiento de PCR, pero esta vez empleando partidores antisentidos que generaran las mutaciones esperadas (ver material y métodos 1.2), se

amplificó la secuencia de la histona H2A de *T. cruzi*, obteniéndose los fragmentos H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu y H2A-Thr¹³¹Asp (resultados no mostrados).

Los fragmentos amplificados por PCR de los genes codificantes para H2A de fenotipo silvestre y de fenotipos mutantes fueron purificados desde geles de agarosa y clonados en el vector pGEM-T *Easy*. Los constructos generados se utilizaron para transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* JM109. Se realizó una selección de clones positivos mediante colorimetría, ampicilina y PCR de colonias, obteniéndose dos colonias positivas para H2A-*wild type*, una para H2A-Thr¹³¹Ala, cinco para H2A-Thr¹³¹Glu y tres para H2A-Thr¹³¹Asp (figura Nro. 4).

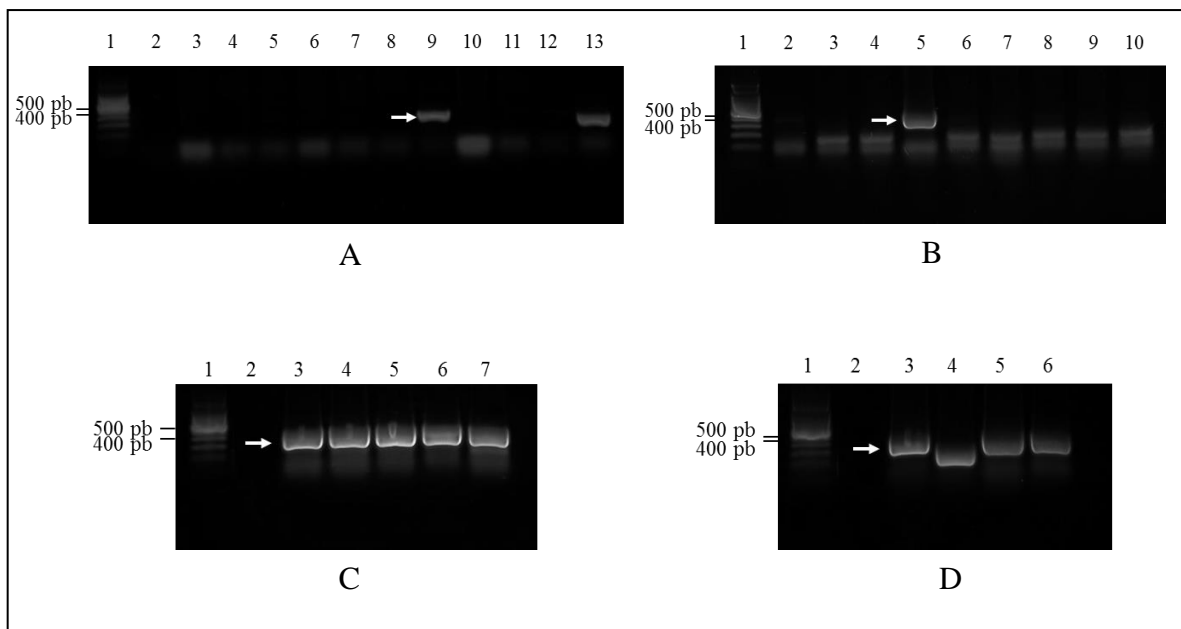


Figura Nro. 4: detección de colonias *E. coli* positivas que presenten los fragmentos de DNA codificantes para H2A-*wild type* (A) y mutantes H2A-Thr¹³¹Ala (B), H2A-Thr¹³¹Glu (C) o H2A-Thr¹³¹Asp (D) insertados en el vector pGEM-T *Easy*. Carril 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega); carril 2: control negativo de la técnica de PCR, sin DNA molde; carriles 3 en adelante: amplificadas de DNA codificantes para H2A-*wild type* (A) o mutantes (B, C y D), utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas. Tamaño esperado de los amplificadas de 405 pb (flechas).

Se seleccionó una colonia bacteriana positiva para cada uno de los constructos: pGEM-H2A-*wild type* (colonia Nro. 7), pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala (colonia Nro. 16), pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu (colonia Nro. 11) y pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp (colonia Nro. 5). Los plasmidios recombinantes fueron purificados a partir de cultivos de las colonias mencionadas y fueron sometidos a secuenciación automática de DNA para comprobar la integridad de los genes, así como para corroborar la presencia de las mutaciones deseadas.

Las secuencias nucleotídicas de H2A-*wild type* (cepa Dm28c) obtenidas luego de secuenciaciones automáticas sentido y antisentido fueron alineadas y comparadas con la secuencia nucleotídica codificante de la histona H2A de *T. cruzi* de la cepa CL Brener anotada en bases de datos (*GenBank accession* XM_814269) (figura Nro. 5). De esta forma se detectó la presencia de tres diferencias nucleotídicas (en verde) entre ambas cepas.

H2ABrener	-----ATGGCAACCCCGAAGCAGGCAGCGAAGAAGCGTCCAAGAAGCACAGCG	49
H2ADm28c-sent	CGCAGACAAGGATGGCAACCCCGAAGCAGGCAGCGAAGAAGCGTCCAAGAAGCACAGCG	480
H2ADm28c-antise	CGCAGACAAGGATGGCAACCCCGAAGCAGGCAGCGAAGAAGCGTCCAAGAAGCACAGCG	158

H2ABrener	GCGGCCGCTCCGCGAAGGCCGGTCTGATCTTCCCCGTGGGCCGTGTGGGCTCGTGCTGC	109
H2ADm28c-sent	GCGGCCGCTCCGCGAAGGCCGGTCTGATCTTCCCCGTGGGCCGTGTGGGCTCGTGCTGC	540
H2ADm28c-antise	GCGGCCGCTCCGCGAAGGCCGGTCTGATCTTCCCCGTGGGCCGTGTGGGCTCGTGCTGC	218

H2ABrener	GCCGCGGCCAGTATGCCCGCCGCATCGGCCGCTCGGGCGCTGTGTACATGGCGGCCGTGC	169
H2ADm28c-sent	GCCGCGGCCAGTATGCCCGCCGCATCGGCCGCTCGGGCGCTGTGTACATGGCGGCCGTGC	600
H2ADm28c-antise	GCCGCGGCCAGTATGCCCGCCGCATCGGCCGCTCGGGCGCTGTGTACATGGCGGCCGTGC	278

H2ABrener	TGGAGTACCTGACAGCCGAGCTGCTGGAGCTGTCCGTGAAGGCGGCGAGCCAGCAGGCAA	229
H2ADm28c-sent	TGGAGTACCTGACAGCCGAGCTGCTGGAGCTGTCCGTGAAGGCGGCGAGCCAGCAGGCAA	660
H2ADm28c-antise	TGGAGTACCTGACAGCCGAGCTGCTGGAGCTGTCCGTGAAGGCGGCGAGCCAGCAGGCAA	338

H2ABrener	AGAAGCCGAAGCGCCTGACACCCCGCAGGCTGACGCTTGCCGTGCGCCACGACGACGACC	289
H2ADm28c-sent	AGAAGCCGAAGCGCCTGACACCCCGCAGGCTGACGCTTGCCGTGCGCCACGACGACGACC	720
H2ADm28c-antise	AGAAGCCGAAGCGCCTGACACCCCGCAGGCTGACGCTTGCCGTGCGCCACGACGACGACC	398

H2ABrener	TCGGCATGCTCCTGAAGGATGTGACGCTGTGCGGTGGTGGTGTGATGCCGAGCCTGAACA	349
H2ADm28c-sent	TCGGCATGCTCCTGAAGGATGTGACGCTGTGCGGTGGTGGTGTGATGCCGAGCCTGAACA	780
H2ADm28c-antise	TCGGCATGCTCCTGAAGGATGTGACGCTGTGCGGTGGTGGTGTGATGCCGAGCCTGAACA	458

H2ABrener	AGGCGTGGCGAAGAAGCACAAAGAGCAGCAAGAAGGCGAGGGCGACGCCAGCGCTTAG	408
H2ADm28c-sent	AGGCGTGGCGAAGAAGCACAAAGAGCAGCAAGAAGGCGAGGGCGACGCCAGCGCTTAG	840
H2ADm28c-antise	AGGCGTGGCGAAGAAGCACAAAGAGCAGCAAGAAGGCGAGGGCGACGCCAGCGCTTAG	518

Figura Nro. 5: alineamiento de las secuencias nucleotídicas de H2A de la cepa Dm28c, secuenciadas con un partidor sentido (H2ADm28c-sent) y antisentido (H2ADm28c-antise), comparadas con la secuencia de H2A anotada en bases de datos del genoma de *T. cruzi* de la cepa CL Brener (H2ABrener). H2ABrener: secuencia nucleotídica del gen codificante para H2A de *T. cruzi* de la cepa CL Brener (*GenBank accession XM_814269*). H2ADm28c-sent y H2ADm28c-antise: secuencias nucleotídicas del gen codificante para H2A de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, obtenidas mediante secuenciación automática de DNA del constructo pGEM-H2A-*wild type*, purificado a partir del cultivo de la colonia bacteriana Nro. 7. Se aprecian diferencias en tres nucleótidos (marcados en verde) de la secuencia codificante para H2A entre ambas cepas.

Con el objetivo de determinar posibles variaciones en la secuencia aminoacídica deducida entre la histona H2A de *T. cruzi* de la cepa Dm28c y CL Brener se realizó un alineamiento entre ambas (figura Nro. 6), observándose 3 diferencias aminoacídicas (en verde).

H2ABrener	MATPKQAAKKASKKHGGRSAGLIFFVGRVGSLLRRGQYARRIGASGAVYMAAVLEYL	60
H2ADm28c	MATPKQAAKKASKKHGGRSAGLIFFVGRVGSLLRRGQYARRIGASGAVYMAAVLEYL	60
	*****.*****	
H2ABrener	TAEELLELSVKAAQQAKKPKRLTPRTVTLAVRHDDDLGMLLKDVTLSRGGVMPSLNKAIA	120
H2ADm28c	TAEELLELSVKAAQQAKKPKRLTPRTVTLAVRHDDDLGMLLKDVTLSRGGVMPSLNKAIA	120
	*****:*****:	
H2ABrener	KKHKSSKKARATPSA-	135
H2ADm28c	KKHKSSKKARATPSA-	135

Figura Nro. 6: alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de H2A de la cepa Dm28c con la secuencia aminoacídica deducida de H2A de *T. cruzi* de la cepa CL Brener. H2ABrener: secuencia aminoacídica deducida de H2A de *T. cruzi* de la cepa CL Brener (*GenBank accession* XM_814269). H2ADm28c: secuencia aminoacídica de H2A de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, deducida de la secuenciación automática de DNA del constructo pGEM-H2A-*wild type*, purificado a partir del cultivo de la colonia bacteriana Nro. 7. Existe una diferencia en tres aminoácidos (marcados en verde) entre ambas cepas para esta secuencia.

Por otro lado, las secuencias nucleotídicas obtenidas luego de la secuenciación automática del vector pGEM-T *Easy* con los insertos H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu y H2A-Thr¹³¹Asp fueron alineadas con la secuencia nucleotídica de H2A-*wild type* de *T. cruzi* cepa Dm28c obtenida (figura Nro. 7), detectándose la presencia de las mutaciones deseadas (en verde).

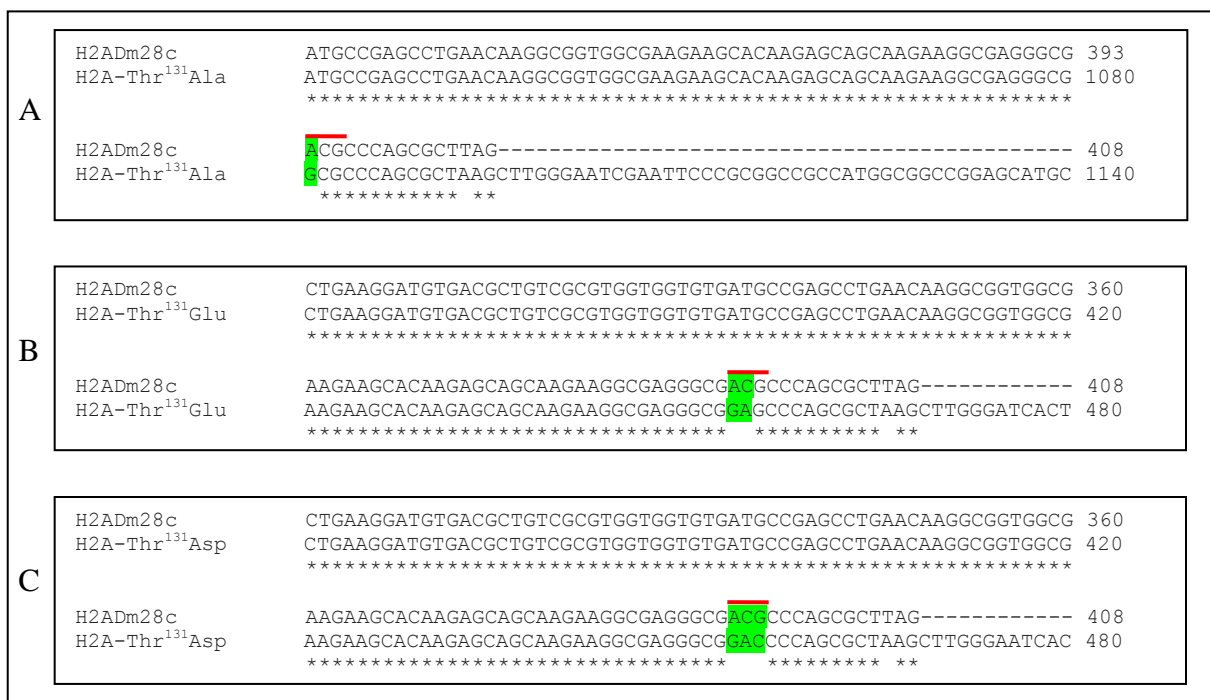


Figura Nro. 7: alineamiento de las secuencias nucleotídicas de H2A mutantes con H2A-wild type de la cepa Dm28c. H2ADm28c: secuencia nucleotídica del gen codificante para H2A de *T. cruzi* de la cepa Dm28c, obtenida mediante secuenciación automática de DNA del constructo pGEM-H2A-wild type, purificado a partir del cultivo de la colonia bacteriana Nro. 7. H2A-Thr¹³¹Ala (A), H2A-Thr¹³¹Glu (B), H2A-Thr¹³¹Asp (C): secuencias nucleotídicas obtenidas de los constructos pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala, pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu y pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp, purificados a partir de los cultivos de las colonias bacterianas Nro. 16, 11 y 5, respectivamente. En los tres casos se observa marcada en verde una mutación por sustitución de bases en el codón codificante para el residuo Thr¹³¹ (marcado en rojo).

A partir de las secuencias nucleotídicas de las histonas H2A mutantes de *T. cruzi* obtenidas, se generaron las secuencias aminoacídicas deducidas y se compararon con la secuencia aminoacídica deducida para la histona H2A de *T. cruzi* de la cepa Dm28c (figura Nro. 8). De esta forma, se detectaron las modificaciones aminoacídicas deseadas (en verde).

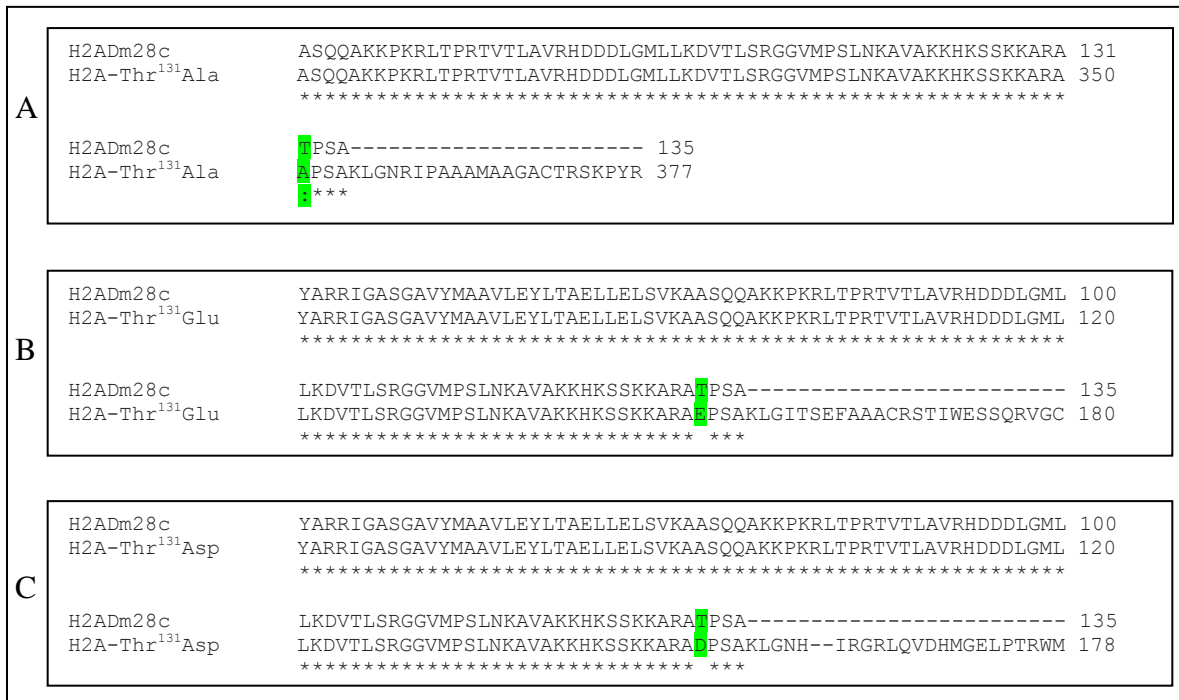


Figura Nro. 8: alineamiento de las secuencias aminoacídicas de H2A mutantes con H2A-wild type, de la cepa Dm28c. H2Adm28c: secuencia aminoacídica de H2A-wild type de la cepa Dm28c, deducida de la secuenciación automática de DNA del constructo pGEM-H2A-wild type, purificado a partir del cultivo de la colonia bacteriana Nro. 7. H2A-Thr¹³¹Ala (A), H2A-Thr¹³¹Glu (B), H2A-Thr¹³¹Asp (C): secuencias aminoacídicas deducidas desde secuencias nucleotídicas obtenidas de los constructos pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala, pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu y pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp, purificados a partir de los cultivos de las colonias bacterianas Nro. 16, 11 y 5, respectivamente. Marcado en verde se observa el reemplazo de Thr¹³¹ por un residuo de alanina (A), ácido glutámico (B) y ácido aspártico (C).

2. Expresar en forma estable las histonas H2A silvestres y mutantes en epimastigotes de *T. cruzi*

Los constructos pGEM-H2A-wild type, pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala, pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu y pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp fueron digeridos con las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III, y los fragmentos génicos liberados fueron purificados desde geles de agarosa (figura Nro. 9).

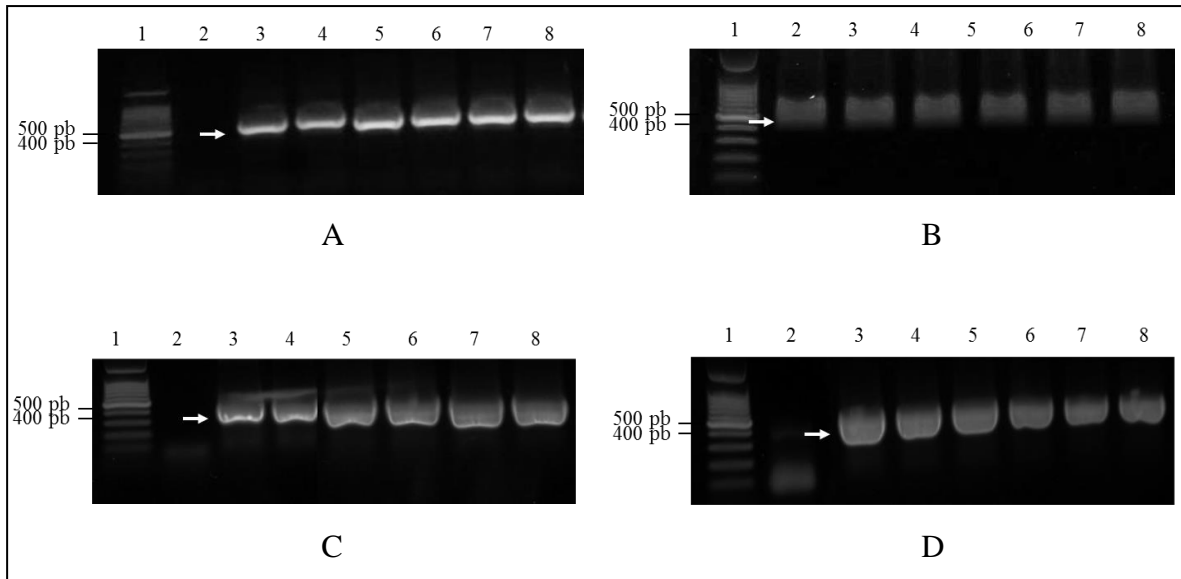


Figura Nro. 9: liberación de fragmentos nucleotídicos codificantes de H2A-*wild type* y mutantes de H2A mediante digestión de los constructos pGEM-H2A-*wild type* (A), pGEM-H2A-Thr¹³¹Ala (B), pGEM-H2A-Thr¹³¹Glu (C) o pGEM-H2A-Thr¹³¹Asp (D) con las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III. Carril 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega); carril 2 (excepto B): control negativo de la técnica de digestión enzimática, sin enzimas de restricción; carril 2 (solo B) y carriles 3 al 8: fragmentos nucleotídicos liberados, tamaño esperado de 405 pb (flecha).

Posteriormente los fragmentos purificados fueron ligados en el vector pTREX-HIS8-GFP, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (*Xma* I y *Hind* III). Se electroporaron bacterias *E. coli* cepa JM109 con los nuevos constructos (pTREX-H2A-*wild type*, pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala, pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp) y se realizó una selección de clones positivos mediante ampicilina y PCR de colonias, obteniéndose cuatro colonias positivas para H2A-*wild type*, dos para H2A-Thr¹³¹Ala, una para H2A-Thr¹³¹Glu y una para H2A-Thr¹³¹Asp (figura Nro. 10). En este último caso también fue posible distinguir la presencia de bandas inespecíficas en algunas colonias.

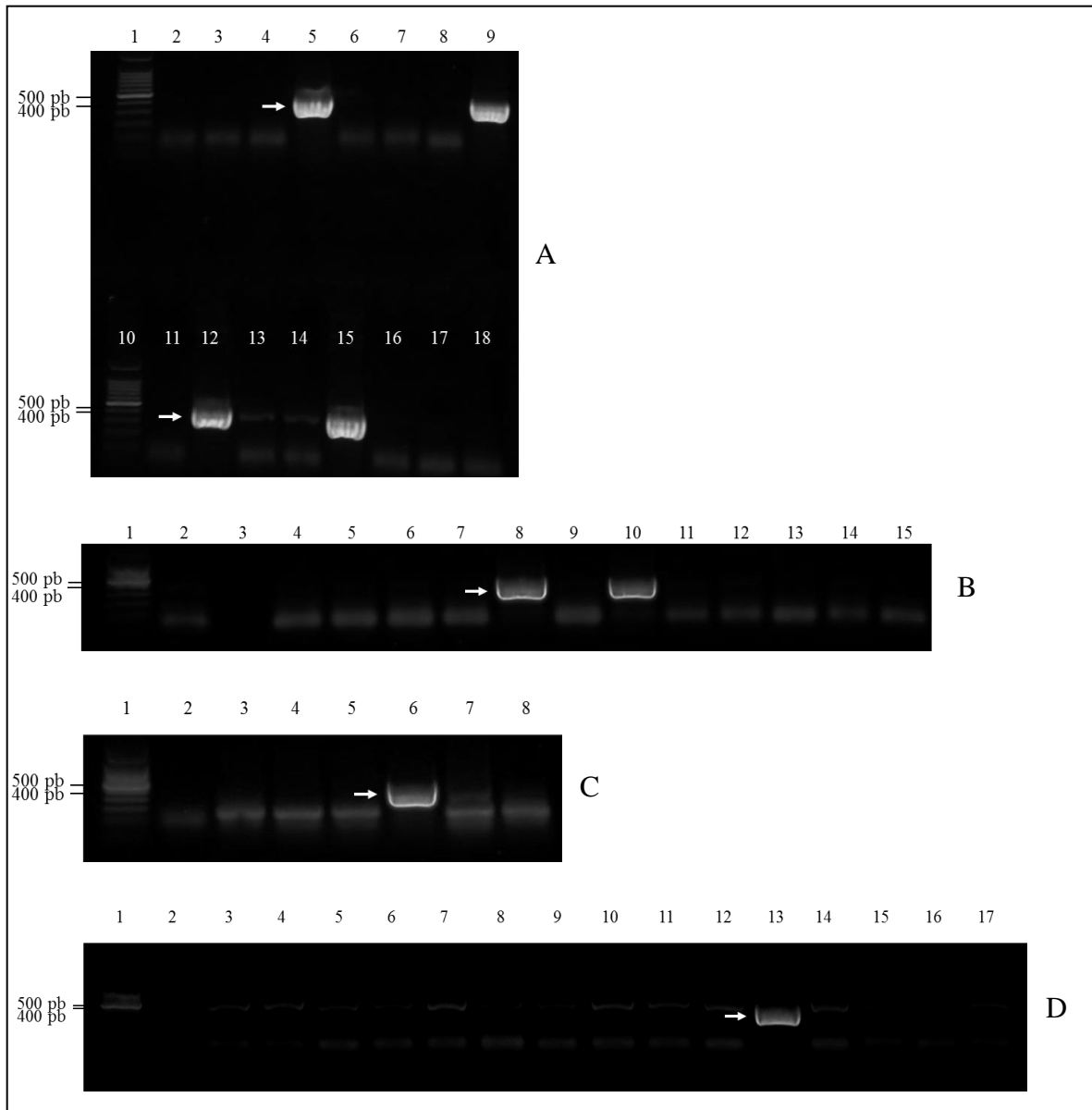


Figura Nro. 10: detección de colonias *E. coli* positivas que presentan los fragmentos de DNA codificantes para H2A-*wild type* (A) y mutantes H2A-Thr¹³¹Ala (B), H2A-Thr¹³¹Glu (C) o H2A-Thr¹³¹Asp (D) insertados en el vector pTREX-HIS8-GFP. Carriles 1 y carril 10A: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega); carril 2: control negativo de la técnica de PCR, sin DNA molde; carriles 3 en adelante (excepto carril 10A): amplificados de DNA codificantes para H2A-*wild type* (A) o mutantes (B, C y D), utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas. Tamaño esperado de los amplificados de 405 pb (flechas).

Se seleccionó una colonia positiva para cada uno de los constructos: pTREX-H2A-*wild type* (colonia Nro. 3), pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (colonia Nro. 11), pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu (colonia Nro. 4) y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (colonia Nro. 11), los cuales fueron purificados desde cultivos de bacterias electroporadas con el objetivo de evaluar nuevamente la presencia de los insertos en el vector. Para tales propósitos, por una parte, se realizó una amplificación confirmatoria mediante PCR de la secuencia codificante para H2A silvestre o mutadas, utilizando los constructos purificados como DNA molde. Para todas las colonias analizadas se observó la presencia de amplificados (en cuadruplicado) para las histonas H2A, de fenotipo silvestre y de fenotipos mutantes (figura Nro. 11). Por otra parte, los constructos purificados se sometieron a ensayos de digestión con las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III con el propósito de observar en geles de agarosa la liberación de los fragmentos del tamaño esperado para las histonas H2A de fenotipo silvestre y de fenotipos mutantes (figura Nro. 12).

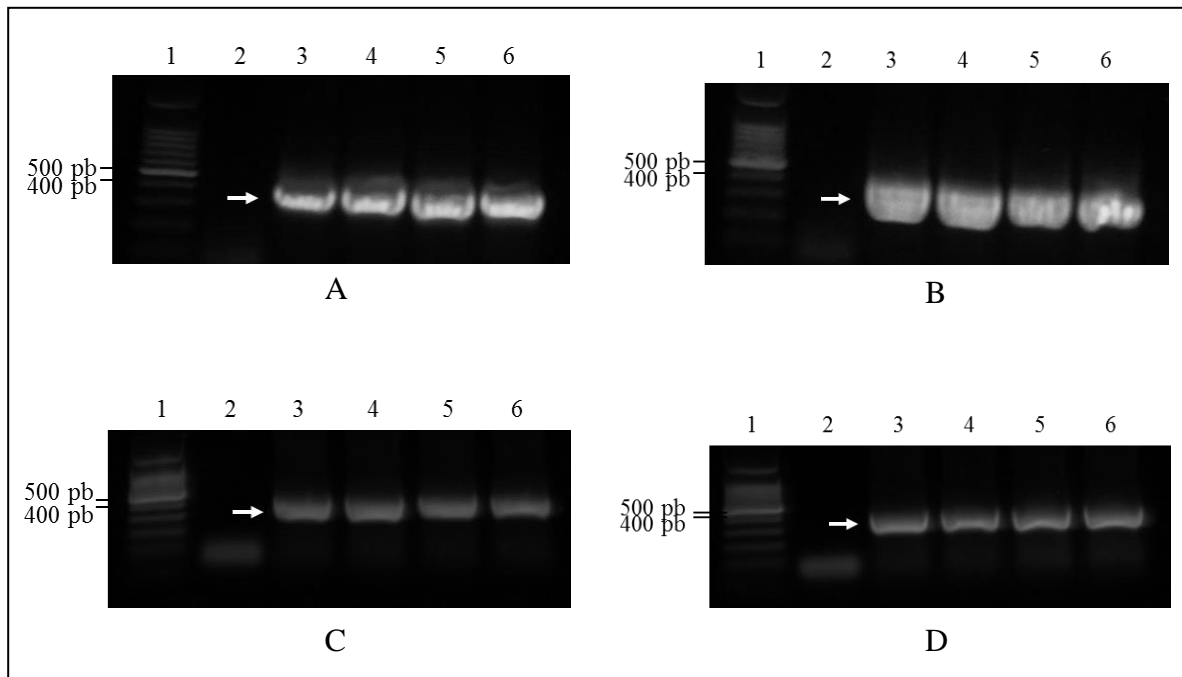


Figura Nro. 11: separación electroforética confirmatoria de la presencia de los insertos de histona H2A-*wild type* y mutantes en los constructos pTREX-H2A-*wild type* (A), pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (B), pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu (C) o pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (D) purificados desde cultivos de las colonias de *E. coli* positivas. Carril 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega); carril 2: control negativo de la técnica de PCR, sin DNA molde; carriles 3 al 6: amplificadas de las secuencias nucleotídicas de H2A-*wild type* y mutantes (en cuadruplicado). Tamaño esperado de los amplificadas de 405 pb (flechas).

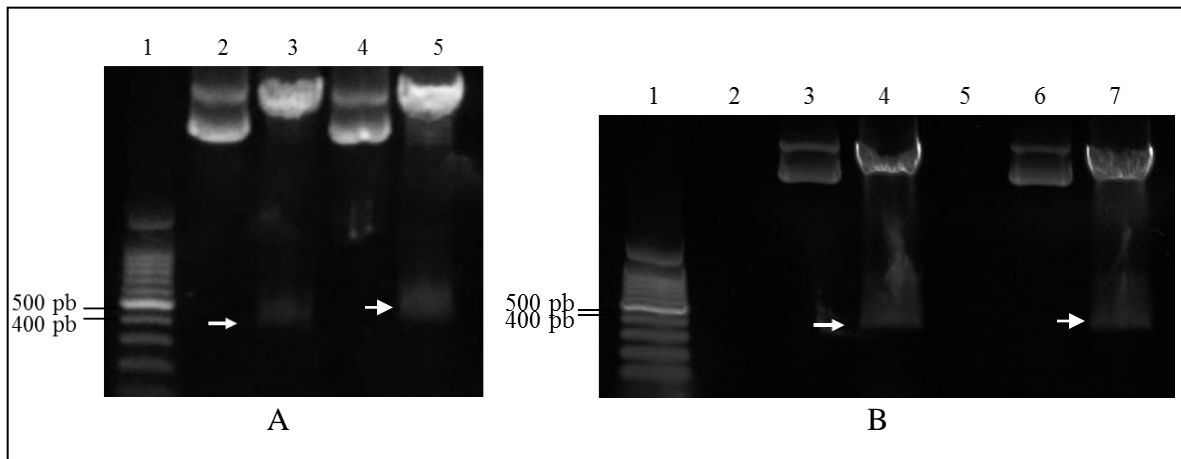


Figura Nro. 12: liberación de fragmentos nucleotídicos codificantes de H2A-*wild type* y mutantes de H2A mediante digestión de los constructos pTREX-H2A-*wild type* y pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (A) o pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (B) con las enzimas de restricción *Xma* I y *Hind* III. Carril 1: marcador de fragmentos de DNA cada 100 pb (Promega); carriles 2 y 4 (A) y 3 y 6 (B): controles negativos de la técnica de digestión enzimática, con presencia del plasmidio, pero sin incubación con enzimas de restricción; carriles 3 y 5 (A) y 4 y 7 (B): fragmentos nucleotídicos liberados de H2A-*wild type*, H2A-Thr¹³¹Ala, H2A-Thr¹³¹Glu y H2A-Thr¹³¹Asp, respectivamente (flechas). Tamaño esperado de 405 pb.

Los constructos purificados fueron sometidos a secuenciación automática de DNA para comprobar la integridad y correcto marco de lectura de los distintos genes. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con la de H2A-*wild type* de *T. cruzi* cepa Dm28c obtenida inicialmente (figura Nro. 13).

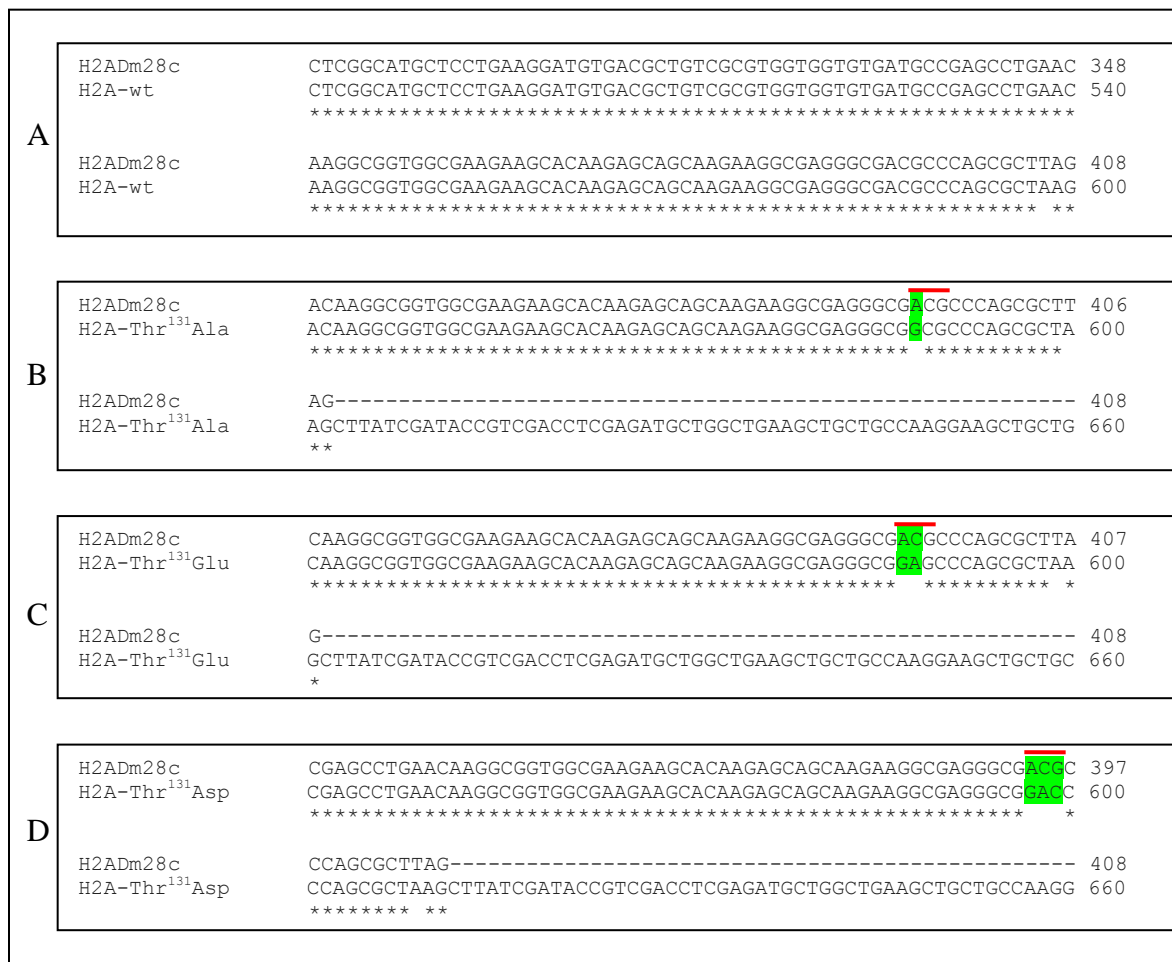


Figura Nro. 13: alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante secuenciación automática de DNA desde los constructos pTREX-H2A-wild type (A), pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (B), pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu (C) o pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (D) con la secuencia nucleotídica codificante para H2A-wild type de la cepa Dm28c (H2ADm28c). Los constructos fueron purificados a partir de los cultivos de las colonias bacterianas Nro. 3, 11, 4 y 11, respectivamente. En A se observa un 100% de identidad entre ambas secuencias. En B, C y D se observa marcada en verde una mutación por sustitución de bases en el codón codificante para el residuo Thr¹³¹ (marcado en rojo).

Posteriormente, se electroporaron epimastigotes de la cepa Dm28c en fase exponencial de crecimiento con los constructos pTREX-H2A-*wild type*, pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala, pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu o pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp. Estos fueron cultivados y seleccionados con el antibiótico G418.

La comprobación de la expresión de cada proteína se hizo mediante visualización directa por microscopía de fluorescencia, pues el vector pTREX-HIS8-GFP genera una proteína de fusión con la proteína fluorescente verde en la región carboxilo-terminal. También se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP de ratón y anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados al fluoróforo Alexa 488. Los epimastigotes transfectados con el vector vacío pTREX-HIS8-GFP expresan la HIS8-GFP en su citoplasma, mientras que la fluorescencia de los parásitos transfectados con los constructos generados para expresar las distintas histonas H2A fusionadas a 8 histidinas (amino terminal) y GFP (carboxilo terminal) se localiza exclusivamente en el núcleo de los epimastigotes (figura Nro. 14).

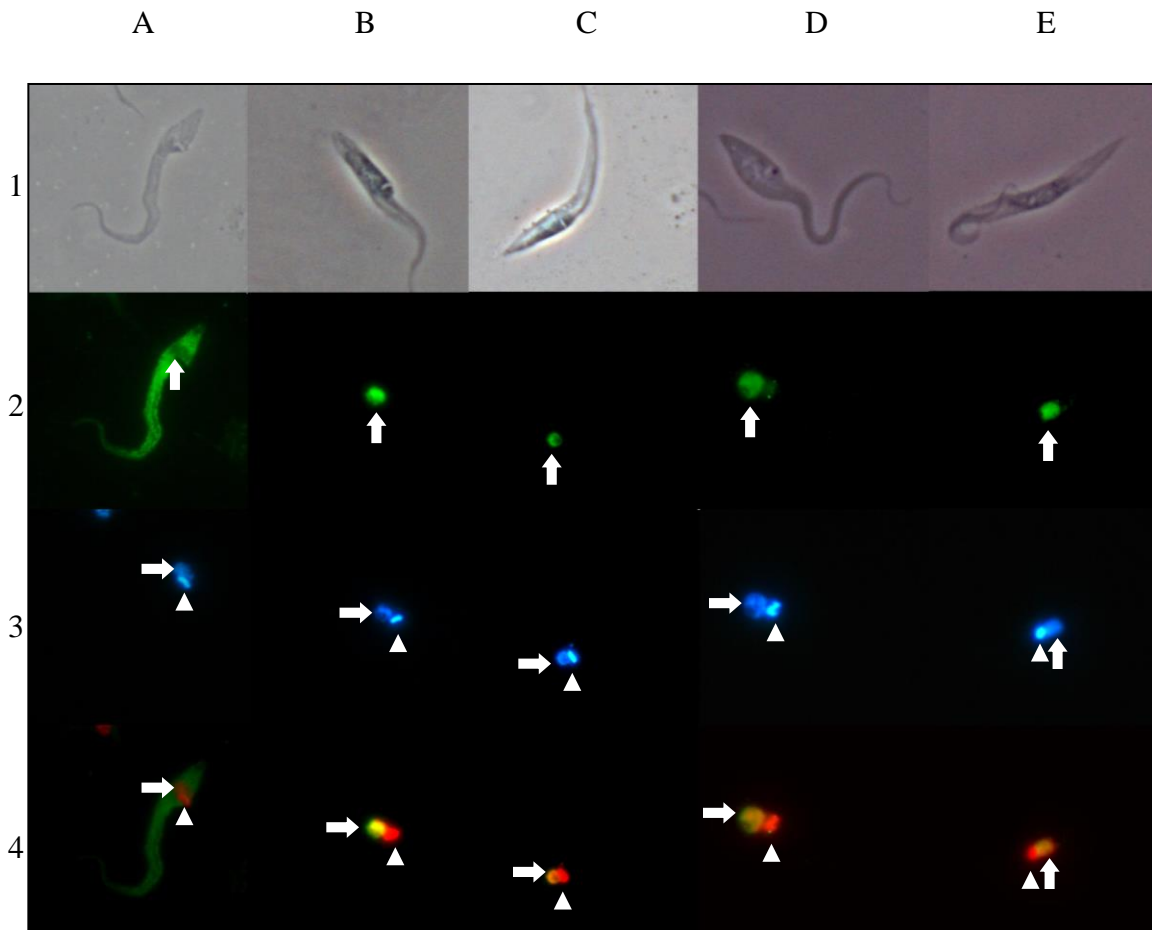


Figura Nro. 14: localización subcelular de la proteína HIS8-H2A-GFP de fenotipo silvestre y proteínas HIS8-H2A-GFP de fenotipos mutantes en epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-HIS8-GFP (control) (A) pTREX-H2A-*wild type* (B), pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala (C), pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu (D) y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp (E). Fila 1: contraste de fase; fila 2: detección de fluorescencia verde (GFP); fila 3: tinción de DNA con DAPI; fila 4: sobreposición GFP-DAPI. Flecha: núcleo; cabeza de flecha: kinetoplasto.

La expresión de HIS8-H2A-GFP silvestre y mutantes también fue evaluada mediante un ensayo de *Western blot* sobre homogeneizados de proteínas totales de los parásitos transfectados, 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 (figura Nro. 15). Como control se utilizaron epimastigotes sin transfectar. Además se utilizó como control epimastigotes transfectados con el vector pTREX-HIS8-GFP vacío, que expresan únicamente la proteína HIS8-GFP de masa molecular cercana a 30 kDa, lo cual concuerda con la banda encontrada (figura Nro. 15, flecha negra). Las proteínas de fusión HIS8-H2A-GFP, tanto de fenotipo silvestre como mutantes, presentan una masa molecular cercana a 44 kDa (figura Nro. 15, flecha roja), pues la masa molecular calculada para H2A es cercana a los 14 kDa. Se observan además algunas bandas de mayor y menor masa molecular a la esperada para las proteínas de fusión HIS8-H2A-GFP, tanto de fenotipo silvestre como mutantes, las cuales podrían corresponder a degradación de proteínas o bien a un reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo empleado.

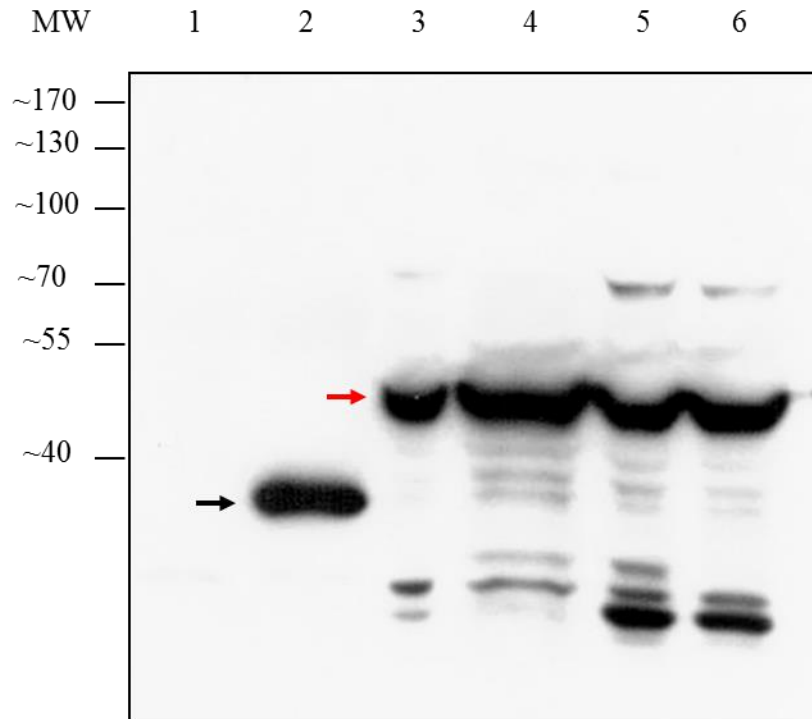


Figura Nro. 15: expresión de la proteínas HIS8-H2A-GFP de fenotipo silvestre y proteínas HIS8-H2A-GFP de fenotipos mutantes en epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Dm28c transfectados. Detección mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP de ratón y anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano. Carril 1: homogeneizado de proteínas totales de epimastigotes sin transfectar (control negativo); carril 2: homogeneizado de proteínas totales de epimastigotes transfectados con el vector pTREX-HIS8-GFP vacío, expresando GFP (flecha negra); carriles 3 al 6: homogeneizado de proteínas totales de epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-H2A-*wild type*, pTREX-H2A-Thr¹³¹Ala, pTREX-H2A-Thr¹³¹Glu y pTREX-H2A-Thr¹³¹Asp, respectivamente, expresando las histonas H2A silvestres y mutantes (flecha roja). MW: marcador de masa molecular (kDa).

DISCUSIÓN

Una de las herramientas más útiles para el estudio de la función de los genes consiste en el silenciamiento de estos (*knockdown*) mediante RNA de interferencia (RNAi), técnica que se ha utilizado con éxito en diversos organismos principalmente por su sencillez y eficiencia. Dentro de estos organismos se incluye al tripanosomátido *T. brucei*. Sin embargo, los intentos para llevar a cabo esta técnica en *T. cruzi* y especies del género *Leishmania* han sido infructuosos (Vázquez, 2007). Recientemente, gracias a la secuenciación del genoma de *T. cruzi* (El Sayed *et al.*, 2005), se descubrió que esta especie carece de algunos componentes esenciales de la maquinaria para la interferencia por RNA, como las proteínas tipo Dicer y Argonauta 1, presentes en *T. brucei*. Esto representa una limitante para la genética funcional en *T. cruzi*, sin embargo, en esta especie se han establecido exitosamente sistemas de transfección de DNA transientes y estables, por medio de vectores (plasmidios) que permiten la sobreexpresión de genes (Vázquez, 2007). La transfección de plasmidios mediante electroporación es, de hecho, la técnica más usada para la introducción de genes foráneos en tripanosomátidos (Lorenzi *et al.*, 2003).

La expresión de la proteína de interés puede verse alterada debido a cambios en el marco de lectura del gen recombinante o por problemas de inestabilidad de los plasmidios dentro de la célula donde se desea expresar dicha proteína. Esto último se asocia a una pérdida en las unidades de vector a repartir entre las células hijas durante la división celular. Cuando se altera la estabilidad de los vectores, se puede producir una anulación completa de la producción de la proteína de interés o una acumulación de proteínas recombinantes aberrantes con mutaciones en su secuencia aminoacídica original (deleciones, adiciones, o sustituciones de bases). Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de los vectores, tales como su tamaño (los plasmidios de mayor tamaño son menos estables), la tasa de proliferación celular, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura en que es mantenido el cultivo celular (Palomares *et al.*, 2004).

En el caso de *T. cruzi*, el primer vector de expresión se desarrolló en 1992 y corresponde a pTEX, el cual presenta la desventaja de obtener bajos niveles de expresión (DaRocha *et al.*, 2004). Luego se desarrolló una segunda generación de vectores, entre los que se encuentran pRIBOTEX y su derivado pTREX (Lorenzi *et al.*, 2003). El plasmidio pTREX destaca por

lograr altos niveles de sobreexpresión, ser más estable en comparación a otros y haber sido usado con éxito en varios análisis genéticos (Vázquez, 2007).

Al utilizar marcadores como GFP, deberían utilizarse constructos de fusión tanto N-terminal como C-terminal, para evaluar cuál constructo resulta ser el mejor para la expresión de un gen en particular (Ma *et al.*, 2012). En estudios previos se han transfectado exitosamente células de origen humano con la histona H2AX tanto de fenotipo silvestre como mutante, utilizando un vector que genera una proteína de fusión N-terminal con GFP (Rios-Doria *et al.*, 2009).

En este trabajo se utilizó una modificación del vector pTREX: pTREX-HIS8-GFP, el cual posee 8 residuos de histidinas y genera una proteína de fusión con GFP en el extremo C-terminal, a diferencia del estudio anterior. No obstante, se logró igualmente sobreexpresar con éxito la proteína H2A en *T. cruzi*, comprobando además la eficiencia de pTREX como vector de expresión en esta especie. Por otra parte, al igual que en el trabajo de Rios-Doria *et al.*, (2009), las histonas marcadas con GFP se localizan a nivel de núcleo, lo cual demuestra que la fusión C-terminal no afecta la localización nuclear de la proteína. La localización de GFP sin asociarse a otra proteína, en cambio, es a nivel de citoplasma, lo cual se observó en la inmunofluorescencia realizada a parásitos transfectados con pTREX-HIS8-GFP vacío.

Si bien la ubicación nuclear de las histonas H2A expresadas ectópicamente sugiere una asociación con la cromatina del parásito, se debe confirmar que estas proteínas se incorporen efectivamente al nucleosoma y no solo posean una asociación a la cromatina. Para estos efectos se pueden realizar estudios de fraccionamiento de nucleosoma con posterior tinción *Coomassie* de las histonas y ensayo de *Western blot* para el marcador GFP (Rios-Doria *et al.*, 2009). Estos ensayos se realizarán fuera del marco de esta memoria.

El estrés oxidativo (ROS/RNS) genera daño en el DNA de diversas especies (Aguiar *et al.*, 2013). En eucariontes, los mecanismos de reparación del DNA dependen de modificaciones en la cromatina (Lukas *et al.*, 2011). En mamíferos se ha comprobado que el evento crucial en las respuestas al daño del DNA corresponde a la fosforilación de un residuo de serina ubicado en un motivo SQ en la región carboxilo-terminal de la histona H2AX, lo cual

generaría un reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina en el sitio del daño (Foster y Downs, 2005). Si bien en tripanosomátidos no se han identificado genes ortólogos para la histona H2AX, en *T. brucei* se corroboró que el residuo Thr¹³⁰ de la histona H2A canónica es efectivamente fosforilado *in vivo* como respuesta al daño del DNA. Para tales efectos se sometieron parásitos al antibiótico *phleomycin*, agente que genera daño en el DNA, y se realizó un ensayo de *Western blot* sobre homogeneizados de proteínas totales utilizando un anticuerpo capaz de reconocer un péptido que presenta en su secuencia la Thr¹³⁰ fosforilada. Como control se utilizaron homogeneizados de parásitos que no fueron sometidos a daño del DNA (Glover y Horn, 2012). Las modificaciones de la histona H2A de *T. cruzi* no han sido caracterizadas (Moretti y Schenkman, 2013), por lo que otra tarea a futuro consiste en estudiar si efectivamente el residuo Thr¹³¹ de H2A de *T. cruzi* (equivalente a Thr¹³⁰ de H2A de *T. brucei*) se fosforila *in vivo* como respuesta al daño del DNA. De esta forma, se esperaría detectar la histona H2A fosforilada en el residuo Thr¹³¹ al realizar ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia (utilizando los anticuerpos capaces de reconocer la secuencia de Thr¹³¹ fosforilada) en parásitos expuestos a agentes genotóxicos, tal como se ha hecho previamente en *T. brucei* (Glover y Horn, 2012).

Finalmente, si se comprueba que la fosforilación del residuo Thr¹³¹ de H2A forma parte de la respuesta frente al daño del DNA, se pueden realizar a futuro ensayos de viabilidad para determinar si las distintas mutaciones de la histona tienen un efecto significativo sobre la supervivencia de epimastigotes sometidos a daño del DNA.

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos realizados por Rios-Doria *et al.* (2009) se esperaría que, ante la imposibilidad de la histona H2A de fosforilarse en el residuo Thr¹³¹, los epimastigotes que expresen H2A-Thr¹³¹Ala sean más sensibles al daño del DNA y por ende tengan una menor sobrevivencia en comparación a los que expresen H2A-*wild type*, que sí pueden montar esta respuesta. Por otra parte, los parásitos que expresen H2A-Thr¹³¹Glu y H2A-Thr¹³¹Asp también deberían tener una menor sobrevivencia en relación a los que expresen H2A-*wild type*, ya que la simulación de una fosforilación del residuo Thr¹³¹ induciría una reducción de la proliferación de los parásitos, independientemente de si hay o no daño del DNA, lo cual promovería la apoptosis celular.

En caso de comprobarse que las mutaciones mencionadas tengan un efecto significativo sobre la supervivencia de epimastigotes sometidos a daño del DNA, este mecanismo de respuesta de *T. cruzi* podría representar un posible blanco terapéutico para generar nuevos agentes farmacológicos que pudieran emplearse para el control de este parásito.

CONCLUSIONES

Es posible generar líneas de epimastigotes de *T. cruzi* que expresen de manera estable la histona H2A fusionada con GFP en el extremo C-terminal, tanto de fenotipo silvestre como de fenotipos mutantes para el residuo Thr¹³¹, por medio de la utilización del vector de expresión pTREX-HIS8-GFP.

Los epimastigotes que expresan estas proteínas se encuentran disponibles para realizar ensayos de viabilidad comparativa frente a la exposición con agentes genotóxicos, lo que podría determinar un posible nuevo blanco terapéutico para la generación de agentes farmacológicos que pudieran emplearse para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIAR, P.H.; FURTADO, C.; REPOLÊS, B.M.; RIBEIRO, G.A.; MENDES, I.C.; PELOSO, E.F.; GADELHA, F.R.; MACEDO, A.M.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D.; TEIXEIRA, S.M.; VIEIRA, L.Q.; GUARNERI, A.A.; ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R. 2013. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. PLoS Negl Trop Dis. 7(6): e2279.

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 Chil Infec. 25(3): 190-193.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair. 3(8-9): 1109-1115.

CABRERA, G.; BARRÍA, C.; FERNÁNDEZ, C.; SEPÚLVEDA, S.; VALENZUELA, L.; KEMMERLING, U.; GALANTI, N. 2011. DNA repair BER pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. J Cell Biochem. 112(8): 2189-2199.

COURA, J.; VIÑAS, P. 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 465(7301): S6-7.

CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. 2004. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infect Immun. 72(7): 4081-4089.

DAROCHA, W.; SILVA, R.; BARTHOLOMEU, D.; PIRES, S.; FREITAS, J.; MACEDO, A.; VÁZQUEZ, M.; LEVIN, M.; TEIXEIRA, S. 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res. 92(2): 113-120.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J.F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309(5733): 409-415.

FOSTER, E.; DOWNS, J. 2005. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J*. 272(13): 3231-3240.

FUENTES, R. 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>. [Consulta: 04-01-2013].

GUERRI-GUTTENBERG, R.; GRANA, D.; AMBROSIO, G.; MILEI, J. 2008. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! *Eur Heart J*. 29(21): 2587-2591.

GLOVER, L.; HORN, D. 2012. Trypanosomal histone γ H2A and the DNA damage response. *Mol Biochem Parasitol*. 183(1): 78-83.

GRAÇA-SOUZA, A.V.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G.O.; BRAZ, G.R.; PAES, M.C.; SORGINE, M.H.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L. 2006. Adaptations against heme toxicity in bloodfeeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*. 36(4): 322-335.

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.

HAZRA, T.; DAS, A.; DAS, S.; CHOUDHURY, S.; KOW, Y.; ROY, R. 2007. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective. *DNA Repair*. 6(4): 470-480.

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(2): 419-424.

- JANZEN, C.; FERNÁNDEZ, J.; DENG, H.; DÍAZ, R.; HAKE, S.; CROSS, G.A.M.** 2006. Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. FEBS Lett. 580(9): 2306-2310.
- JERCIC, M.A.; GONZÁLEZ, C.; OYARCE, A.; CANCINO, B.; MAC-LEAN, M.** 2012. La enfermedad de Chagas en Chile: componente vectorial y serología en menores de 5 años durante el período 2005-2010. [En línea]. El Vigía. 13(27): 7-11. <http://epi.minsal.cl/epi/0notransmisibles/revista/vigia27/articulo_2.pdf>. [Consulta: 16-01-2014].
- LORENZI, H.A.; VÁZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J.** 2003. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. Gene. 310: 91-99.
- LUCIANO, B.S.; HSU, S.; CHANNAVAJHALA, P.L.; LIN, L.L.; CUOZZO, J.W.** 2004. Phosphorylation of threonine 290 in the activation loop of Tpl2/Cot is necessary but not sufficient for kinase activity. J Biol Chem. 279(50): 52117-52123.
- LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J.** 2011. More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. Nat Cell Biol. 13(10): 1161-1169.
- MA, Y.F.; WEISS, L.M.; HUANG, H.** 2012. A method for rapid regulation of protein expression in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 42(1): 33-37.
- MANDAVA, V.; FERNÁNDEZ, J.; DENG, H.; JANZEN, C.; HAKE, S.; CROSS, G.** 2007. Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 156(1): 41-50.
- MORETTI, N. S.; SCHENKMAN, S.** 2013. Chromatin modifications in trypanosomes due to stress. Cell Microbiol. 15(5): 709-717.
- MINISTERIO DE SALUD.** 2010. Encuesta Nacional de Salud ENS Chile 2009-2010. Santiago, Chile. Tomo II, capítulo 5. Pontificia Universidad Católica de Chile, Fac. de Medicina, Depto. de Salud Pública. 803 p.
- PALOMARES, L.A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O.T.** 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **In:** Balbás, P.; Lorence, A. Recombinant gene expression: reviews and protocols. Segunda Edición. Humana Press. Nueva Jersey, Estados Unidos. pp. 15-51.
- 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.
- RASSI, A. JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.** 2010. Chagas disease. Lancet. 375(9723): 1388-1402.
- RASSI, A. JR; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J.** 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin N Am. 26(2): 275-291.

RILEY, P.A. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 65(1): 27-33.

RIOS-DORIA, J.; VELKOVA, A.; DAPIC, V.; GALÁN-CARIDAD, J.; DAPIC, V.; CARVALHO, M.; MELENDEZ, J.; MONTEIRO, A. 2009. Ectopic expression of histone H2AX mutants reveals a role for its post-translational modifications. *Cancer Biol Ther.* 8(5): 422-434.

SEPÚLVEDA, S.; VALENZUELA, L.; PONCE, I.; SIERRA, S.; BAHAMONDES, P.; RAMÍREZ, S.; ROJAS, V.; KEMMERLING, U.; GALANTI, N.; CABRERA, G. 2014. Expression, functionality, and localization of apurinic/apyrimidinic endonucleases in replicative and non-replicative forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem.* 115(2): 397-409.

THE CENTER OF FOOD SECURITY AND HEALTH. 2009. American trypanosomiasis. [En línea]. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_american.pdf>. [Consulta: 11-05-2013].

TYLER, K.; ENGMAN, D. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31(5-6): 472-481.

URBINA, J.; DOCAMPO, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19(11): 495-501.

VÁZQUEZ, M.P. 2007. The genetics and genomics of *Trypanosoma cruzi*. *Intl J Biomed Pharma Sci.* 1(1):1-11.

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

ANEXOS

Anexo Nro. 1: certificado del Comité de Bioseguridad.



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

Santiago, May 27th 2010.-

To:
FONDECYT PROGRAM
PRESENT

Dear Sirs

The Risk Prevention and Biosafety Unit of the Faculty of Medicine, University of Chile hereby certifies that it received for its study, from responsible investigator, Prof. Gonzalo Cabrera Vallejos, the project proposal titled as "CHAGAS CHRONIC DISEASE: MECHANISM OF T. CRUZI PERSISTENCE IN MACROPHAGES AND IN CARDIAC HOST CELLS", Cellular and Molecular Biology Laboratory Cellular and Molecular Biology Program, Institute of Biomedical Sciences (ICBM), Faculty of Medicine, University of Chile which satisfies all basic Biosafety requirements to be carried out. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1st edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2nd edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4^a edition, "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

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

Receiving acknowledgement: Professor Gonzalo Cabrera Vallejos

Professor **Monica Acuna Patzke**
Risk Prevention and Biosafety Unit Director

* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project

c.c.

- Dean, Doctor, Cecilia Sepúlveda C.
- Vice-Dean, Dr. Ennio Vivaldi
- Biomedical Sciences Institute, Director ICBM, Dr. Norbel Galanti
- Responsible Investigator, Prof. Gonzalo Cabrera Vallejos
- Archives

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