



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

**“EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA ENDONUCLEASA
APURÍNICA/APIRIMIDÍNICA APE1 HUMANA Y SU DOMINANTE
NEGATIVO EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*
SOMETIDOS A ESTRÉS OXIDATIVO”**

PAULA ALEJANDRA BAHAMONDES LEÓN

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

PROFESOR GUÍA: GONZALO CABRERA

**SANTIAGO – CHILE
2016**

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

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Proyecto Bicentenario Anillo ACT 112, CONICYT, Chile.
- Proyectos FONDECYT 1090124, 11100053 y 1130113.

DEDICATORIA

“Hay hombres que luchan un día y son bueno;
Hay otros que luchan un año y son mejores;
Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos;
Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles”

Bertolt Brecht

Al ser más imprescindible de todos,
Extrañándote siempre, madre amada.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de biología molecular y celular de la facultad de medicina de la Universidad de Chile, que me abrió sus puertas para poder terminar la última etapa de mi vida universitaria en pre grado, mostrándome un lado muy distinto de lo que conocía hasta el momento “la investigación”, a mis compañeros de laboratorio por enseñarme todo lo que no sabía, a Santiago por llevarme al laboratorio, a Sofi por tenerme paciencia, a Iván por estar siempre ahí, a mis nuevos amigos que quedaron, Claudia por tardes de patines y risas, Osvaldo por tener a alguien con quien pelear siempre, a Roger por su incondicional apoyo, cuidado y por seguir a mi lado, a Gonzalo por brindarme todo el apoyo mucho más allá de lo académico, jamás olvidaré todo lo que hiciste por mí, y a todos en conjunto por estar conmigo en el momento más difícil de mi vida, por hacerme reír y olvidar un rato lo que pasaba, estoy segura de que de haber llegado a otro lugar a hacer mi tesis las cosas hubieran sido mucho más duras, gracias por la contención, el afecto y los abrazos sinceros.

A mi madre que me dejó en este camino, quizás en el tiempo que más la necesité, pero hacerme entender finalmente que fue el tiempo en que ella más nos necesitó y necesitaba que la dejáramos ir, por enseñarme a luchar aunque todo se venga abajo, por tener fuerza para abrazarme y decirme una palabra de aliento en el tiempo en el que se le iba la vida aceleradamente, pensando siempre más en tus hijos, siempre más en los demás, simplemente por enseñarme a amar desinteresada y realmente.

Gracias a la vida por ponerme en el lugar indicado en el tiempo preciso.

LISTA ABREVIATURAS

AP	apurínica/apirimidínica
APE1	endonucleasaapurínica/apirimidínica de <i>Homo sapiens</i> 1
Benznidazol	N-benzil-2- nitroimidazol-1-acetamida
ver	reparación por escisión de bases
BSA	albúmina de suero bovino
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
ELISA	ensayo inmunoenzimático
G418	Neomicina
GFP	proteína fluorescente verde
GO	glucosa oxidasa
HAI	hemoaglutinación indirecta.
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HRP	peroxidasa de rábano picante
ICBM	Instituto de Ciencias Biomédicas
IFI	inmunofluorescencia indirecta
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MX	Metoxiamina

Nifurtimox	4-[(5-nitrofurfurilideno) amino]-3- metiltiomorfolino-1, 1-dióxido
NO	óxido nítrico
NOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ ⁻	anión superóxido
OH ⁻	radical hidroxilo
PCR	reacción de polimerasa en cadena
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
RI	radiaciones ionizantes
ROS	especies reactivas del oxígeno
SFB	suero fetal bovino
TcI	linaje I de <i>T. cruzi</i>
TcVI	linaje VI de <i>T. cruzi</i>
TcAP1	endonucleasaapurínica/apirimidínica de <i>Trypanosoma cruzi</i> 1
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
UDGasa	Uracil DNA glicosilasa
UV	radiación ultravioleta

kDa	Kilodalton
μM	Micromolar
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
mM	Milimolar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	22
Figura 2: Vías de reparación por escisión de bases (BER)	32
Figura 3: Alineamiento múltiple de la región catalítica de las endonucleasas AP de <i>T. cruzi</i> (TcAP1 y TcAP2) con <i>Homo sapiens</i> (APE1 y APE2) y <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Apn2p)	35
Figura 4: Amplificación del fragmento codificante de la endonucleasa APE1 de <i>Homo sapiens</i>	45
Figura 5: Alineamiento entre secuencias nucleotídicas de <i>ape1</i> y pMT/V5- <i>ape1</i> .	46
Figura 6: Amplificación del fragmento de DNA codificante de APE1 que genera la mutación D-N en diferentes colonias de <i>E. coli</i> transformadas	48
Figura 7: Aliniamiento entre secuencias nucleotídicas de <i>ape1</i> y pMT/V5- <i>ape1</i> mutación D-N	49
Figura 8: Amplificación del fragmento de DNA codificante de APE1 que genera la mutación D-N y E-Q, en diferentes colonias de <i>E. coli</i> transformadas.	50
Figura 9: Alineamiento entre secuencias nucleotídicas de <i>ape1</i> y pMT/V5- <i>ape1</i> mutación E-Q	51
Figura 10: Comprobación mediante PCR de la presencia de la secuencia codificante de APE1 humano en colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el constructo pTREX- <i>his8-gfp</i>	53

Figura 11: Identificación mediante digestión enzimática de la presencia de los insertos <i>ape1</i> y <i>ape1DN</i> en los constructos <i>pTREX-his8-ape1-gfp</i> y <i>pTREX-his8-ape1DN-gfp</i> purificados desde colonias de <i>E. coli</i> positivas	54
Figura 12: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para APE1 humana con el producto de la secuenciación automática del constructo <i>TREX-his8-ape1DN-gfp</i>	55
Figura 13: Detección de las proteínas expresadas por el vector vacío <i>pTREX-gfp</i> y por los constructos <i>pTREX-his8-ape1-gfp</i> y <i>pTREX-his8-ape1DN-gfp</i> en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados.	57
Figura 14: Localización subcelular de HIS8-APE1-GFP Y de HIS8-APE1DN-GFP en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	59
Figura 15: HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP presentan ubicación nuclear y citosólica en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	61
Figura 16: Selección de parásitos transfectados con <i>pTREX-his8-ape1-gfp</i> y <i>pTREX-his8-ape1DN-gfp</i> por citometría de flujo.	63
Figura 17: Viabilidad de epimastigotes transfectados con HIS8-APE1-GFP sometidos a estrés oxidativo agudo.	65
Figura 18: Viabilidad de epimastigotes transfectados con HIS8-APE1DN-GFP sometidos a estrés oxidativo agudo.	66
Figura 19: Purificación de la proteína recombinante HIS8-APE1DN-GFP.	68

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
FUENTES DE FINANCIAMIENTO	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURA	5
INDICE DE FIGURA	8
RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.	17
1.2. Etiología de la enfermedad de Chagas.	19
1.3. Ciclo de vida <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
1.4. Transmisión de la enfermedad.	22
1.5. Signos clínicos y formas de presentación.	24
1.6. Diagnóstico.	26
1.7. Tratamiento.	27
1.8. <i>Trypanosoma cruzi</i> y estrés oxidativo.	28
1.9. Vía de reparación del DNA por escisión de bases.	30
1.10. Endonucleasa APE-1.	32
1.11. Hipótesis.	36

1.12. Objetivo general.	36
1.13. Objetivos específicos.	36
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. Cultivo y recuento de epimastigotes de <i>Trypanosoma c.</i>	37
2.2. Inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano en el vector pMT/V5.	37
2.3 Clonamiento e inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano en el vector de expresión pTREX- <i>his8-gfp</i> .	40
2.4. Transfección de epimastigotes con los plasmidios pTREX- <i>his8-gfp</i> , pTREX- <i>his8-ape-gfp</i> y pTREX- <i>his8-ape1DN-gfp</i> .	41
2.5. Determinación de la expresión de las proteínas HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP mediante ensayos de western blot.	42
2.6. Localización subcelular de las proteínas recombinantes HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP expresadas en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> transfectado.	42
2.7. Determinación de la viabilidad de epimastigotes recombinantes expuestos a estrés oxidativo agudo.	43
2.8. Obtención de la proteína HIS8-APE1DN-GFP en condiciones nativas.	44
2.9. Análisis Estadístico.	44

2.10. Bioseguridad.	44
3. RESULTADOS	45
3.1 Inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano en el vector pMT/V5.	45
3.2 Mutación de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano para obtener la secuencia que codifica para su dominante negativo de APE1.	47
3.3 Inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 y APE1DN humano en el vector de expresión pTREX- <i>his8-gfp</i> para <i>Trypanosoma cruzi</i> .	52
3.4 Transfección de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con los plasmidios pTREX- <i>his8-ape1-gfp</i> y pTREX- <i>his8-ape1DN-gfp</i> y, evaluación de la expresión de las proteínas.	56
3.5 Análisis de la localización subcelular de las proteínas expresadas por los plásmidos <i>pTREX-his8-ape1-gfp</i> y <i>pTREX-his8-ape1DN-gfp</i> en epimastigotes transfectados.	58
3.6 Evaluación de la viabilidad de los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> transfectados con los plasmidios pTREX- <i>his8-ape1-gfp</i> y pTREX- <i>his8-ape1DN-gfp</i> expuestos a estrés oxidativo agudo.	62
3.7 Obtención de la proteína HIS8-APE1DN-GFP.	67
4. DISCUSIÓN	69
5. CONCLUSIÓN	73
6. BIBLIOGRAFÍA	74

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es uno de los principales problemas de salud pública en América Latina. Dicha patología determina además severas consecuencias a nivel socioeconómico, tanto en la región endémica como en países no endémicos, debido a la globalización de la enfermedad. El agente causal es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* el cual afecta diversas especies de mamíferos, incluido el humano. Este parásito unicelular presenta un ciclo de vida indirecto, precisando de un vector biológico para su transmisión (insectos hematófagos triatominos). *T. cruzi* se encuentra en tres formas celulares: epimastigote en insectos vectores; tripomastigote, tanto en vectores triatominos (tripomastigote metacíclico) como en hospederos mamíferos (tripomastigote sanguíneo) y amastigote, forma intracelular presente en hospederos mamíferos. Estas diversas formas parasitarias dan cuenta de la gran plasticidad del parásito para adaptarse a las diferentes condiciones del medio al que se enfrenta, lo que implica notables cambios de su forma, motilidad y características bioquímicas. *T. cruzi* sobrevive al daño del ADN por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas en ambos hospederos, probablemente por activación del mecanismo de escisión de bases (vía BER), proceso altamente conservado en el que las endonucleasasapurínicas/apirimidínicas (APEs) juegan un rol fundamental.

APE1 es la principal AP endonucleasa de *Homo sapiens* encargada de reparar sitios abásicos en el DNA. Estudios demuestran que ratones carentes de APE1 mueren tempranamente en el desarrollo, poniendo de manifiesto su importancia en la reparación del DNA. Indagaciones destinadas a hacer más eficientes los tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer, desarrollaron una forma dominante negativa para APE1 que se une al sustrato con una mayor afinidad que la proteína nativa, pero que carece de actividad AP endonucleasa. De esta forma se impediría la reparación del DNA de células tumorales, incrementando su porcentaje de apoptosis por acción de anticancerígenos genotóxicos. En *T. cruzi* se ha descrito la secuencia del gen ortólogo de *ape1* (*tcap1*) y se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi* incrementa su viabilidad frente a H₂O₂ y NOO⁻.

En esta Memoria de Título se desarrollaron vectores plasmidiales destinados a expresar la forma nativa de APE1 humana, así como del dominante negativo de APE1

(APE1DN) en epimastigotes de *T. cruzi*. Tanto APE1 como APE1DN presentaron una localización preferentemente nuclear; sin embargo también fue posible detectar ambas proteínas en el citoplasma de los parásitos transfectados. La expresión de la forma nativa de APE1 otorgó mayor resistencia a parásitos frente a la exposición de concentraciones crecientes de H₂O₂; por el contrario, la expresión de APE1DN incrementó la sensibilidad de los epimastigotes a dicho agente oxidante probablemente por la inhibición de la actividad endonucleasa apurínica/apirimidínica parasitaria. Finalmente se purificó en condiciones nativas la proteína APE1DN desde homogeneizados de epimastigotes transfectados; esta proteína recombinante será utilizada en ensayos bioquímicos posteriores. Sobre la base de estudios previos que demuestran un incremento de la resistencia a agentes oxidantes de epimastigotes que sobreexpresan TcAP1, los resultados de esta Memoria de Título sugieren un importante grado de conservación en la actividad endonucleasa apurínica/apirimidínica entre humano y parásito. Sin embargo, debido al escaso nivel de conservación aminoacídica entre TcAP1 parasitaria y APE1 humana (cerca al 30%) es factible el desarrollo de agentes químicos que permitan inhibir específicamente la endonucleasa parasitaria y, consecuentemente, la vía BER de *T. cruzi*, sin afectar a *Homo sapiens*. Estos inhibidores podrían potenciar el efecto citotóxico de daño oxidativo al DNA generado por cardiomiocitos y células del sistema inmune innato.

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American Trypanosomiasis, is one of the most important public health problems in Latin America, with consequences in the economy and social wellness of endemic countries. Today this illness is taking a major impact due to its expansion to non endemic regions. The causative agent of this disease is *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite which infects many mammals, including humans. Vectorial transmission of Chagas' disease is produced by infected triatomine insects that upon feeding on mammal blood, deposits feces with infective parasites (trypomastigotes) that are ingested in vacuoles (parasitophorous vacuoles) in host cells. In the cytoplasm, trypomastigotes differentiate to round amastigotes that undergo 8-9 cycles of multiplication before transforming back to trypomastigotes that escape to circulation. Upon infection of target tissues trypomastigotes change to intracellular amastigotes (amastigote nests) that maintain *T. cruzi* infection for life. Eventually, blood trypomastigotes may be ingested by a triatomine and transformed to epimastigotes in the vector's midgut. After multiplication, epimastigotes move to the insect hindgut where they differentiate into infective metacyclic trypomastigotes. Thus, this parasite presents an important plasticity, adapting to different media which implies changes in shape, motility and biochemical properties.

In its life cycle, *T. cruzi* must overcome diverse oxygen and nitrogen reactive species (ROS and RNS, respectively) that induce DNA damage. For *T. cruzi* survival, resulting in the development of a chronic infection in mammal hosts, the parasite has to repair its DNA, most probably by activation of the base excision repair pathway (BER). This is a highly conserved mechanism, where apurinic/apyrimidinic endonucleases (APEs) play a key role.

APE1 is the main AP endonuclease in *Homo sapiens* devoted to repair abasic sites in damaged DNA. The importance of this enzyme is demonstrated by studies in which mice depleted of APE1 die early during development. Interestingly, studies directed to develop new drugs against cancer have shown that a dominant negative form of that enzyme (APE1DN) binds to an apurinic/apyrimidinic substrate with higher affinity than the native protein, but without AP endonuclease activity. Thus, APE1DN impedes DNA repair in tumor cells, increasing apoptosis induced by genotoxic anti-tumoral drugs. In *T. cruzi* the sequence of an orthologous *ape1* gene (*tcape1*) has been described and it has been shown that over-

expression of the TcAPE1 protein in epimastigotes increases the viability of parasites when chased with H₂O₂ or NOO⁻.

In this work plasmidial vectors expressing human APE1 in *T. cruzi* epimastigotes, as well its negative dominant form (APE1DN), have been developed. Both, APE1 and APE1DN, are mostly located in the nucleus though a low signal was also present in the cytoplasm of transfected parasites. Expression of native human APE1 conferred resistance of transfected parasites to H₂O₂ exposition. Contrarily, expression of the APE1DN form increases the sensitivity of parasites when exposed to H₂O₂, probably by inhibition of the native apurinic/apyrimidinic enzyme activity. Additionally, APE1DN was purified in native conditions from transfected epimastigotes homogenates; this recombinant protein will be used in the future in biochemical assays.

Considering that epimastigotes over-expressing TcAP1 show an increase in the resistance to ROS/RNS, results of the present work suggest an important conservation in the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity among *Homo sapiens* and *T. cruzi*. However, considering the low level of amino acidic conservation between the parasite TcAPE1 and the human APE1 (approx. 30%), it may be possible to develop chemicals directed to inhibit the parasite endonuclease activity without affecting the human one. Those inhibitors could potentiate the parasite DNA damage induced by ROS/RNS generated in the parasitophorous vacuole and by the immune system.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epidemiología:

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue descrita por primera vez en 1909 por el médico y profesor brasileño Carlos Chagas (1879-1934), durante la ejecución de un proyecto de erradicación de la malaria en el estado de Minas Gerais, Brasil (Chagas, 1909; Andrade y Andrews., 2005). Este investigador detectó la presencia de parásitos flagelados en la sangre periférica de pacientes que padecían una enfermedad cuyos signos y síntomas no se correlacionaban con patologías descritas previamente. El parásito, agente causal de esta enfermedad, fue denominado por Chagas como *Schizotrypanum cruzi* (más tarde rebautizado como *Trypanosoma cruzi*). Chagas describió detalladamente el ciclo de vida de *T. cruzi* e identificó a insectos de la familia de los triatomíneos como los vectores biológicos del parásito.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis endémica de América Latina que ocupa el cuarto lugar de importancia en cuanto a discapacidad laboral, después de patologías respiratorias, diarreas y SIDA. Además la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, 2006) ha identificado a la enfermedad de Chagas como la enfermedad parasitaria más importante en Latinoamérica, así como la principal causa de enfermedad cardíaca (PAHO, 2006; Avila *et al.*, 2013) Se estima que cerca de 10-15 millones de personas se encuentran infectadas y 75-90 millones en riesgo de contraer la enfermedad (Coura, 2007; Higuchi *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2009, Ávila *et al.*, 2013). Anualmente, se infectan aproximadamente unos 200.000 adultos y 300.000 niños (Coura, 2007). Esta patología presenta una amplia distribución geográfica que se extiende desde el sur de los E.E.U.U. al sur de Argentina y Chile (región endémica). Sin embargo, ha sido descrita en Canadá, Europa y otras regiones no endémicas debido, fundamentalmente, a migraciones de individuos infectados (Rassi *et al.*, 2010; Schmunis y Yadon, 2010; Souza *et al.*, 2011) los que son capaces de diseminar la enfermedad mediante transmisión no vectorial (Bern, 2011; WHO, 2007), lo que origina cambios sustanciales en la epidemiología de la enfermedad (Gascon y Pinazo, 2008).

En el ciclo de vida de *T. cruzi* intervienen insectos hematófagos del grupo de los hemípteros triatominos (Minsal, 2012) como vectores biológicos y diversos hospederos mamíferos, incluido el hombre. Los reservorios de *T. cruzi* corresponden a más de 150 especies de mamíferos domésticos y de vida silvestre. Estos últimos son particularmente importantes ya que hacen imposible la erradicación del parásito (De Souza, *et al.*; 2002). En Chile, estudios moleculares recientes basados en la detección de DNA de *T. cruzi* en mamíferos nativos de un área hiperendémica determinaron una prevalencia por sobre el 60% (Botto Mahan, 2012).

En Chile, el área endémica se extiende desde la XV región de Arica-Parinacota a la VI región del Libertador Bernardo O'Higgins (específicamente desde el paralelo 18°30' al 34°36' de Latitud Sur), incluyendo la región Metropolitana. Actualmente, existen cerca de 98.000 personas infectadas (Minsal, 2012) y más de 850.000 individuos expuestos a contraer la enfermedad (Apt *et al.*, 2008). La enfermedad es más frecuente en áreas rurales y periurbanas (el 6% de la población total del país) asociadas a condiciones de pobreza, donde residen insectos vectores hematófagos. En Chile se conocen 4 especies de vectores insectos triatominos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica*, esta última recientemente descrita. Estas especies ocupan distintos ecotopos, tanto silvestres como peridomésticos, que abarcan el extremo norte del país (*M. gajardoi*), norte grande (*T. infestans*, *M. spinolai* y *M. parapatrica*) y la zona central (*T. infestans* y *M. spinolai*) (Minsal, 2012). En el país, al igual que en el resto de Sudamérica, *T. infestans* es el principal vector de la enfermedad de Chagas (Minsal, 2012). Esta especie, participa en el ciclo doméstico de la enfermedad y se ha informado que sobre el 50% de dichos triatominos son portadores de *T. cruzi* (Minsal, 2015). Cabe señalar que aproximadamente el 7% de la dieta de *T. infestans* la obtiene desde la especie humana (Canals *et al.*, 1999). Por otra parte, *M. spinolai* y *M. gajardoi*, son especies silvestres de hábitos principalmente diurnos. Por tal motivo su participación en el ciclo de vida de *T. cruzi* es menor en comparación a *T. infestans*. El desarrollo de los insectos hematófagos triatominos incluye un estadio de huevo, cinco estadios ninfales y el adulto. Todas los estadios ninfales, así como los individuos adultos son hematófagos, es decir, se alimentan de vertebrados de sangre caliente (mamíferos y aves) (Botto Mahan, 2012).

Debido principalmente a iniciativas impulsadas por el CONOSUR, se aplicaron políticas tendientes a erradicar a los vectores biológicos de la enfermedad de Chagas. Chile fue declarado en 1999 libre de la transmisión vectorial de dicha parasitosis, al igual que Uruguay (1997) y parte de Brasil (2000) (Días *et al.*, 2008). De esta forma, adquirieron mayor relevancia epidemiológica otras formas de transmisión de la patología como la transplacentaria y la transfusional (Gascon *et al.*, 2010; Moncayo 2003; WHO, 2002). A su vez, evidencia empírica generada durante los programas de control de vectores de varias décadas señalan que es posible recolectar algunos ejemplares de *T. infestans* en ambiente silvestre (Gürtler, 2009).

En la actualidad, la enfermedad de Chagas continúa presente en el listado de patologías de declaración obligatoria del país (Minsal, 2015).

2.2 Etiología:

Trypanosoma cruzi, es un parásito protozoo hemoflagelado, perteneciente al phylum Sarcomastigoforos, subphylum mastigoforos, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae (Rassi *et al.*, 2012). Dentro de esta familia se han identificado diversos parásitos de importancia médica y médica veterinaria como *Trypanosoma brucei*, agente causal de la enfermedad del sueño en África y *Leishmania* sp., responsable de leishmaniasis en todo el mundo (Teixeira *et al.*, 2006). La presencia ancestral de *T. cruzi* en tierras americanas queda de manifiesto luego de indagaciones que detectaron DNA parasitario en muestras de tejido de momias de países andinos precolombinos (Perú y Chile) de aproximadamente 9.000 años antes de Cristo (Aufderheide *et al.*, 2004)

Antiguamente, las cepas de *T. cruzi* se clasificaban en dos grupos genéticos o linajes, de acuerdo a los ambientes ecológicos donde habitaban sus vectores: *T. cruzi* I (TcI) de tipo selvático y *T. cruzi* II (TcII) presentes en el ciclo doméstico. Entre las pertenecientes al ciclo selvático se encontraban las cepas Colombia, Dm28c y Tulahuén, y entre las cepas de ciclo doméstico las cepas Y, Berenice y Esmeraldo (Briones *et al.*, 1999; Zingales *et al.*, 1999). Sin embargo en la actualidad diversos estudios genéticos concluyeron en la generación de una nueva nomenclatura. Sobre la base de un número de marcadores genéticos y bioquímicos,

las cepas de *T. cruzi* se han dividido en seis unidades discretas de tipificación (DTU) conocidas como TC I, II, III, IV, V y VI (Zingales *et al.*, 2009).

T. cruzi posee un flagelo y una única mitocondria que contiene el kinetoplasto, una red de DNA correspondiente al genoma mitocondrial del parásito, localizada cerca del cuerpo basal del flagelo (Rassi *et al.*, 2012). El material genético nuclear del parásito se encuentra organizado en pequeños cromosomas que no se condensan a cromosomas metafásicos durante la división celular. Al analizar el material genético de diversas cepas y clones de *T. cruzi* se ha podido establecer diferencias de hasta un 40% en el contenido total de DNA (Rassi *et al.*, 2010; Bern *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2007). Así, la cantidad de total de DNA (nuclear mas kinetoplasto) varía desde 0,12 hasta 0,33 pg por célula entre las diversas cepas, así como en clones aislados a partir de la misma cepa (Rassi *et al.*, 2009; Ministerio de Salud Brasil, 2005).

2.3 Ciclo de vida de *T. cruzi*:

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 1) es indirecto y se inicia cuando un insecto triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado, ingiriendo formas extracelulares, infectivas, no replicativas del parásito (tripomastigotes sanguíneos). Una vez ingeridos, la mayor parte de los tripomastigotes se lisan en el intestino anterior del insecto. Los tripomastigotes sobrevivientes se diferencian en epimastigote, forma extracelular, no infectiva, replicativa del parásito (De Souza *et al.*, 2010). Luego de varias divisiones, los epimastigotes se asocian a una membrana no celular (quitinosa) conocida como membrana pseudo-peritrófica que recubre el sistema digestivo del triatomino. Esta etapa de adhesión parece ser importante para desencadenar la diferenciación de los epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos en las regiones posteriores del intestino del vector. Cuando el triatomino infectado vuelve a alimentarse del mismo u otro mamífero, elimina sobre la piel sus deyecciones que contienen tripomastigotes metacíclicos altamente infectivos. Estos ingresan al mamífero por el sitio de la picadura, facilitado por el rascado de la zona y por las enzimas proteolíticas presentes en la saliva del insecto. Una vez en la submucosa dérmica, los parásitos son internalizados e incorporados en una vesícula parasitófora al interior de

células del hospedero mamífero, principalmente macrófagos. Posteriormente, los tripomastigotes escapan de la vesícula hacia el citoplasma y se diferencian a amastigotes, forma replicativa e intracelular. Tras una serie de divisiones los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que lisan la célula, liberándose al torrente sanguíneo, dirigiéndose a diferentes tejidos blanco como músculo liso, músculo cardíaco, células de la glía del sistema nervioso central y placenta. Posteriormente, cuando un triatomino se alimenta de sangre del mamífero infectado, ingiere los tripomastigotes sanguíneos, cerrando el ciclo de vida (Tyler y Engman, 2001).

Aunque *T. cruzi* es capaz de infectar casi cualquier célula nucleada en ensayos *in vitro*, presentan tropismo por algunos tejidos como músculo cardíaco y esquelético (Brenner, 1973; Macedo y Peña.; 1998), nervios entéricos (da Silveira *et al.*, 2007; da Silveira *et al.*, 2008) y adipocitos. (Pines *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011).

La gran variedad de mamíferos capaces de ser parasitados por *T. cruzi*, así como la notable plasticidad celular evidenciada en las diversas formas celulares capaces de ser adoptadas por dicho protozoario, desempeñan un papel fundamental en la persistencia parasitaria, a pesar de la presencia de la inmunidad de los hospederos (Fernández y Andrews., 2012)

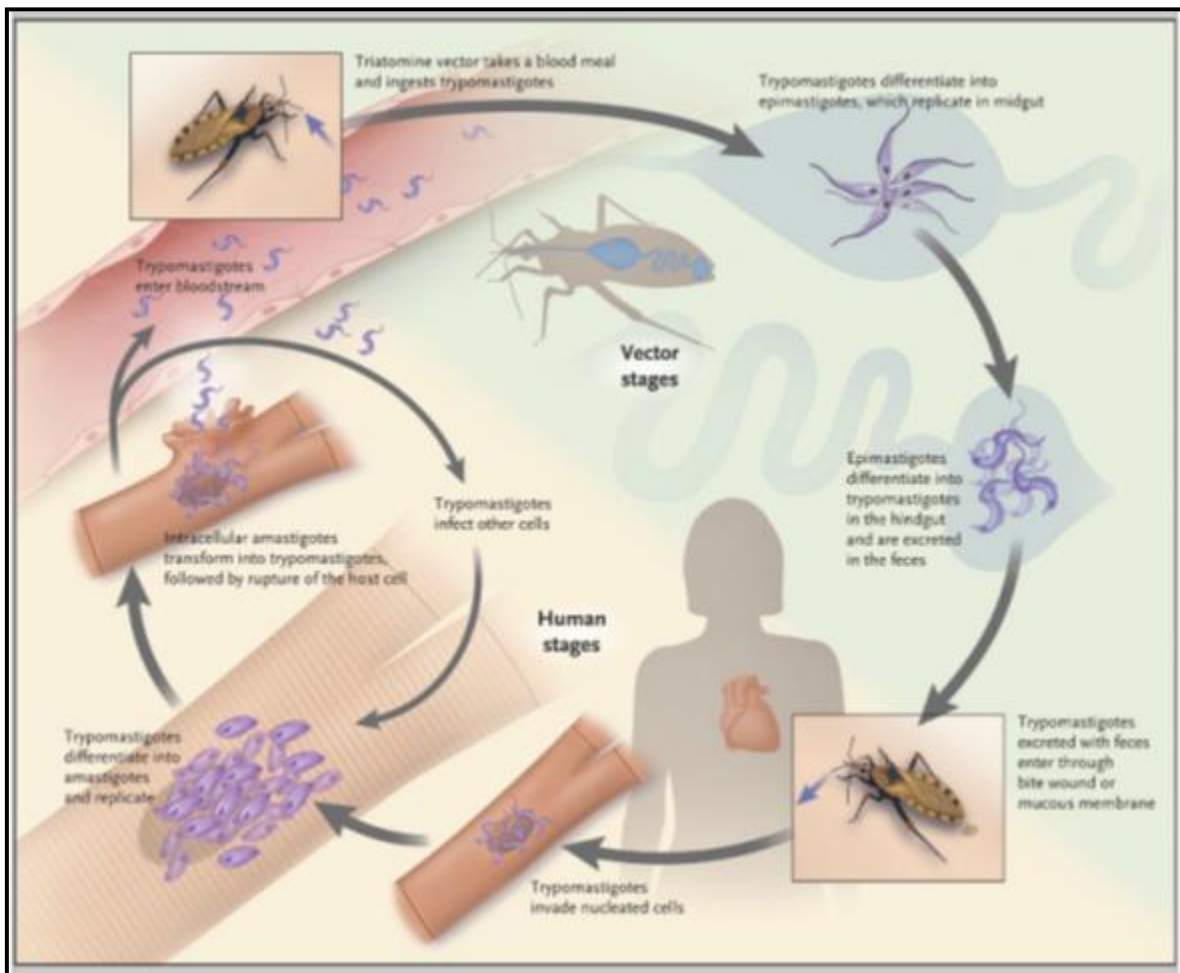


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi* (Bern., 2011)

2. 4 Formas de transmisión:

- Transmisión vectorial: Continúa siendo la forma de transmisión predominante para los humanos en áreas endémicas donde aún no ha sido posible controlar al vector biológico (Bern., 2011).
- Transmisión congénita: De gran importancia actualmente en Chile, este tipo de transmisión se produce luego de que una madre embarazada infectada con *T. cruzi* transmite el parásito a su hijo durante el embarazo o durante el parto. Un estudio realizado en Chile por el ISP reportó que aproximadamente un 6,6% de las madres infectadas transmitirán el parásito a sus hijos (Jercic *et al.*, 2010), perpetuando de esta manera la patología en ausencia del vector

(Bern., 2011; Schielke *et al.*; 2002). El riesgo de transmisión congénita aumenta cuando la madre presenta altos niveles de parasitemia o una respuesta inmune deficiente (Bern., 2011; Torrico *et al.*, 2004; Bern y Montgomery, 2009, Bittencourt, 1992, Andrade, 1982).

- Transmisión sanguínea: La vía transfusional fue documentada por primera vez en 1952 (Freitas *et al.*, 1952). Desde esa fecha se ha estimado que el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por unidad de sangre infectada transfundida es de 10 a 25% (Minsal, 2015). Por tales motivos, el tamizaje serológico para pesquisar al parásito en bancos de sangre continúa siendo obligatorio en casi todos los países de América Latina donde la enfermedad es endémica (Moncayo y Ortiz, 2006; Schmunis y Cruz, 2005). En Chile, desde el año 1996 es obligatorio el tamizaje del parásito en bancos de sangre de áreas endémicas. Desde el año 2008 este procedimiento se extendió a todos los servicios de sangre del país (Minsal, 2011).

- Trasplante de órganos: Se ha descrito que individuos receptores que reciben un órgano de un donante infectado con *T. cruzi* pueden desarrollar un cuadro agudo de la enfermedad de Chagas. Indagaciones realizadas por Riarte *et al.*, (1999) señalan que aproximadamente un 20% de individuos que recibieron riñones provenientes de pacientes chagásicos adquirieron la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, se postula que el riesgo de infección por trasplante de corazón es considerablemente más alto comparado con trasplante de riñón o hígado.

- Transmisión oral: Actualmente la propagación de la enfermedad de Chagas se ha centrado cada vez más en la vía oral de transmisión debido al incremento de brotes, principalmente en Brasil y Venezuela, atribuibles a fruta o jugo de la caña de azúcar contaminada con *T. cruzi* o por deyecciones del vector (Beltrao *et al.*, 2009; De Noya *et al.*, 2010; Toso *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha descrito gran cantidad de pequeños brotes que afectan a grupos familiares que residen en regiones amazónicas debido a consumo de fruta de palma, la cual parece ser particularmente vulnerable a la contaminación con insectos vectores o deyecciones de triatomíneos (Coura *et al.*, 2002; Nobrega *et al.*, 2009).

- Accidentes de laboratorio: Los casos conocidos de infección accidental de *T. cruzi* en laboratorios médicos o de investigación, obedecen fundamentalmente a problemas en la manipulación de triatomíneos, animales infectados, cultivos de parásitos o material biológico proveniente de pacientes infectados (Minsal, 2011).

2.5 Signos clínicos y formas de presentación de la enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas puede cursar en tres fases progresivas de presentación. El período de incubación luego de la inoculación vectorial con tripomastigotes metacíclicos es de aproximadamente 1 a 2 semanas, después de lo cual se da comienzo a la **fase aguda** de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2010). Esta fase dura entre 8 a 12 semanas, caracterizándose por la presencia de tripomastigotes circulantes detectables por microscopía en frotis de sangre fresca o de la capa leucocitaria y suele ser asintomática en aproximadamente un 95% de los casos. Sin embargo, en el 5% restante puede provocar fiebre, malestar, mialgia, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, hepato y esplenomegalia y una lesión furuncular en la zona de la inoculación (chagoma). Cuando el ingreso del parásito ha sido por la conjuntiva ocular, se produce un edema unilateral bpalpebral, normalmente indoloro, acompañado de inflamación de los nódulos linfáticos regionales denominado signo de Romaña. La enfermedad aguda grave se presenta en menos del 1% de los pacientes. En estos casos las manifestaciones incluyen miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis (Acquatella, 2007; Maguire, 2004), lo que generalmente determina una alta mortandad. La transmisión por vía oral de *T. cruzi* parece estar asociada a una morbilidad aguda severa y mayor mortalidad en comparación con la infección adquirida mediante la vía vectorial (Beltrao *et al.*, 2009; Secretaria de vigilancia em saude de Brasil, 2007). Por otra parte, la mayoría de los recién nacidos infectados con Chagas congénito son asintomáticos o tienen alteraciones leves (Bern y Montgomery., 2009; Torrico *et al.*, 2004) que puede incluir: bajo peso al nacer, prematuridad, puntuaciones bajas de Apgar y en algunos casos hepatoesplenomegalia, anemia y trombocitopenia (Bittencourt *et al.*, 1981; Bittencourt *et al.*, 1975; Maguire 2004; Torrico *et al.*, 2004). Neonatos gravemente afectados pueden presentar meningoencefalitis, megasindromes gastrointestinales, anasarca, neumonitis y/o dificultad respiratoria (Bittencourt *et al.*, 1981; Bittencourt *et al.*, 1984; Torrico *et al.*, 2004).

La fase aguda es seguida de un período de duración variable (de meses a años) en el que no se presentan signos ni síntomas llamada **fase indeterminada**. A pesar de la ausencia de parásitos detectables en sangre periférica, las personas que cursan esta fase mantienen el potencial de transmitir *T. cruzi* al insecto vector o transmitirlo directamente a otros seres

humanos mediante transfusiones sanguíneas, donación de órganos o por transmisión congénita (Maguire 2004; WHO expert committee 2002).

Aproximadamente un tercio de los individuos infectados que cursan la fase indeterminada ingresan a la **fase crónica** de la enfermedad que se caracteriza por lesiones irreversibles que afectan principalmente al corazón (90% de los casos) y sistema digestivo (megaesófago y megacolon en el 4,5% de los casos). La cardiopatía chagásica se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico que afecta a todas las cámaras cardíacas, genera daño en el sistema de conducción, y a menudo presentar aneurisma apical (Bern, 2011). Actualmente se considera que en la patogénesis de la miocarditis chagásica es fundamental la persistencia del parásito y las lesiones generadas por el sistema inmunitario del hospedero en el tejido cardíaco (Marin-Neto *et al.*, 2007). Los signos que se presentan comúnmente durante la fase crónica son miocarditis asociadas a arritmias, cardiomiopatías dilatadas progresivas con insuficiencia cardíaca congestiva e hipertrofia de las fibras miocárdicas (Coura, 2007). Estas anormalidades pueden conducir a palpitaciones, síncope y un alto riesgo de muerte súbita (Rassi *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2001). Por otra parte, las afecciones gastrointestinales son menos comunes, observándose predominantemente en pacientes de países del Cono Sur como Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Sur del Perú, Uruguay y parte de Brasil. Sin embargo, es poco frecuente en el norte de América del Sur, América Central y México. Este patrón geográfico se cree que está relacionado con las diferencias en los genotipos predominantes de *T. cruzi* en las diferentes regiones de la zona endémica (Campbell *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2003). Las lesiones digestivas derivadas de la infección por *T. cruzi* generalmente afectan al esófago y/o colon, como resultado del daño al sistema nervioso entérico (plexos intramurales) (de Oliveira *et al.*, 1998; de Rezende y Moreira 1988; Mota *et al.*, 1984). Las alteraciones generadas sobre el esófago abarcan desde trastornos asintomáticos hasta cuadros severos de megaesófago (de Oliveira *et al.*, 1998). Los síntomas incluyen disfagia, odinofagia, reflujo gastroesofágico, pérdida de peso, neumonía por aspiración, tos y regurgitación (Atias, 1994; Brucher, 2001). A su vez, los cuadros de megacolon se caracterizan por estreñimiento prolongado que pueden dar lugar a fecalomas, vólvulos e isquemia intestinal (Atias, 1994).

2.6 Diagnóstico:

El método de diagnóstico para identificar la infección por *T. cruzi* varía dependiendo del estado del paciente y de la fase de la enfermedad en que se encuentre. Etapas iniciales de la infección por *T. cruzi* se caracterizan por la presencia del parásito en la sangre y por lo tanto se utilizan comúnmente métodos de detección directos. Así, la principal forma de diagnóstico en pacientes en fase aguda es la detección microscópica de tripomastigotes, utilizando para ello preparaciones frescas de sangre no coagulada (WHO, 2002). También se realiza el método de la gota gruesa, donde se tiñe y se observa la presencia sanguínea del parásito al microscopio y el método de "microstrout", donde se observan los parásitos en un capilar de microhematocrito (Minsal, 2011). El método de xenodiagnóstico, utiliza insectos triatominos libres de patógenos (criados en el laboratorio) a los cuales se les permite alimentar con sangre del individuo a diagnosticar. Posteriormente se analiza el tracto intestinal del vector en busca de formas parasitarias. Debido a que el nivel de parasitemia disminuye ostensiblemente dentro de los 90 días post inoculación, incluso en pacientes sin tratamiento, no se utiliza la detección por microscopía en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad (Wegner y Rohwedder 1972; WHO, 2002). Finalmente, la reacción de polimerasa en cadena (PCR) es una herramienta sensible que se ha utilizado con éxito para detectar el DNA parasitario y confirmar el diagnóstico de individuos que cursan la fase aguda de la enfermedad (Herwaldt, 2001; Herwaldt, *et al.*, 2000; Kun, *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en pacientes que cursan la fase crónica se basa principalmente en métodos indirectos que detectan anticuerpos IgG generados contra el parásito. Entre ellos destacan: i) el método de enzima inmuno ensayo (ELISA), que detecta el conjugado formado por un anticuerpo humano e inmunoglobulina específica contra el parásito; ii) hemoaglutinación indirecta, basado en la aglutinación de glóbulos rojos sensibilizados con *T. cruzi*; iii) inmunofluorescencia Indirecta (IFI), que detecta la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* capaces de unirse a epimastigotes; iv) ensayos de *Western Blot* (Inmunoelectrotransferencia), que detecta la presencia de anticuerpos contra antígenos de *T. cruzi* separados mediante electroforesis (Minsal, 2011). Para corroborar el diagnóstico se deben realizar al menos dos ensayos serológicos, pues ninguna técnica por sí sola es suficientemente específica y sensible (WHO, 2007). Durante la fase crónica, también se

utiliza la detección del DNA del parásito mediante la técnica de PCR como método diagnóstico (Rassi *et al.*, 2010).

2.7 Tratamiento:

Hasta el momento, las únicas drogas disponibles para el tratamiento farmacológico de la enfermedad de Chagas son el nitrofurano Nifurtimox y el nitroimidazol Benznidazol. Ambos compuestos fueron introducidos empíricamente en las décadas de los 60 y 70 del siglo pasado (Urbina y Docampo., 2003). La experiencia de varias décadas ha demostrado que ambas drogas presentan una actividad tripanocida significativa durante la fase aguda de la infección. Sin embargo, la eficacia de estas drogas disminuye notoriamente luego de semanas posteriores a la inoculación del parásito, siendo muy limitada en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Irigoin *et al.*, 2008).

El tratamiento (además de individuos que cursan la fase aguda) también está indicado para aquellos pacientes en los que la infección ha sido reactivada, por ejemplo debido a inmunosupresión, para lactantes con infección congénita y para pacientes en fase crónica temprana. Los beneficios potenciales de la medicación para prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad de Chagas deben sopesarse frente a la larga duración de tratamiento (hasta 2 meses) y las posibles reacciones adversas que se producen en hasta el 40% de los pacientes tratados (WHO, 2013). Estas reacciones estarían asociadas al mecanismo de acción inespecífico de ambos fármacos. Así, se ha descrito que nifurtimox genera efectos secundarios gastrointestinales de manera frecuente (30 a 70% de los pacientes) que incluyen anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y molestias abdominales. También es bastante común la generación de toxicidad neurológica asociada a los tratamientos con nifurtimox, como irritabilidad, insomnio, desorientación y, menos frecuentemente, temblores. Por su parte, los tratamientos con benznidazol han sido asociados a efectos secundarios dermatológicos consistentes en erupciones por fotosensibilización que raramente progresa a dermatitis exfoliativa. La tolerancia de ambos medicamentos es mejor en los niños que en los adultos. Por otra parte, benznidazol y nifurtimox no deben ser administrado a mujeres embarazadas o a personas con insuficiencia renal o hepática (Rassi *et al.*, 2010). Nifurtimox

también está contraindicado en personas con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos (WHO, 2013).

Considerando los antecedentes mencionados, es urgente desarrollar fármacos específicos más eficaces y selectivos, particularmente para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

2.8 T. cruzi y estrés oxidativo:

Se define como estrés oxidativo al aumento de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) y/o una disminución de los mecanismos antioxidantes de defensa celular (Dusting y Triggle, 2005). El metabolismo aeróbico utiliza oxígeno molecular como aceptor final en la transferencia de electrones dentro de la mitocondria, donde es reducido a moléculas de agua. Sin embargo, sucesivas reducciones univalentes del oxígeno molecular pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) altamente inestables, tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (OH^{\cdot}) (Shackelford *et al.*, 2000). Estos ROS pueden generar daño a diferentes macromoléculas celulares, principalmente al DNA. Por otra parte, células del sistema inmune innato, particularmente los macrófagos, pueden producir gran cantidad de ROS, y óxido nítrico (NO^{\cdot}), en respuesta a microorganismos patógenos. El radical NO^{\cdot} puede reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ y producir anión peroxinitrito ($NOO^{\cdot-}$), agente generado comúnmente por macrófagos como primera línea de defensa durante la fagocitosis. Además, $O_2^{\cdot-}$ es un precursor de H_2O_2 que a su vez, en presencia de hierro (II) y cobre (I), es responsable de la formación de OH^{\cdot} (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La mayoría de los parásitos protozoarios son células aeróbicas capaces de sobrevivir en ambientes oxigenados (Mehlotra, 1996). El ingreso de los tripomastigotes a los macrófagos genera una vesícula parasitófora donde se aloja el parásito. En la membrana de esta vesícula se ensambla el sistema NADPH oxidasa, que cataliza la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) (Hogg *et al.*, 1992); adicionalmente, ingresan a la vesícula parasitófora especies reactivas de nitrógeno (RNS) producidas por el metabolismo de L-arginina (Piacenza *et al.*, 2009). Tanto ROS como RNS son esenciales

para el control de la infección. Sin embargo, estos mecanismos de defensa no son capaces de eliminar completamente al parásito, estableciéndose las fases indeterminada y crónica de la enfermedad (Piacenza *et al.*, 2009). A su vez, se ha detectado una generación sostenida de ROS/RNS en el citoplasma de células cardíacas con amastigotes, en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad. Estudios indican que cardiomiocitos infectados crónicamente con la forma amastigote de *T. cruzi*, sobrepasan las defensas antioxidantes presentando un estado de estrés oxidativo permanente (Zacks *et al.*, 2005; Paiva *et al.*, 2012). Sin embargo, el parásito es capaz de sobrevivir por largos períodos en el tejido cardíaco, determinando la aparición de los signos y síntomas característicos de la miocarditis chagásica (Piacenza *et al.*, 2009). La formación de ROS/RNS que se genera en el tejido cardíaco infectado es atribuible a dos procesos: un importante grado de infiltrado inflamatorio presente en el miocardio y la disfunción mitocondrial que afecta a los cardiomiocitos parasitados (Gupta, *et al.*; 2009).

Por otra parte, se ha descrito que los epimastigotes también son capaces de sobrevivir al ambiente oxidativo que se genera en el intestino medio del vector triatomino producto de la degradación de la hemoglobina presente en la sangre ingerida por el parásito (Graca-Souza *et al.*, 2006). La hemoglobina está formada por cuatro subunidades de globina asociadas a un grupo hemo (Balla *et al.*, 2005; Gozzelino *et al.*, 2010). El grupo hemo es una molécula usualmente asociada a cadenas de polipéptidos a través de interacciones entre el hierro y residuos de histidina o metionina. Cataliza muchos procesos de oxidación y se relaciona con importantes funciones biológicas, entre ellas el transporte de oxígeno. También participa en la respiración celular relacionándose con los citocromos y con enzimas de detoxificación P450, además de cumplir roles de regulación de la señalización celular. No obstante esta molécula puede resultar tóxica dada su habilidad para generar especies reactivas del oxígeno (Paes *et al.*, 2011).

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* sufre una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas, proporcionando a cada forma celular la capacidad de sobrevivir en un nuevo entorno (Díaz *et al.*, 2011). La capacidad del parásito para evadir la respuesta oxidativa del hospedero se correlaciona directamente con su infectividad (Piacenza *et al.*, 2009).

En resumen, las tres formas celulares de *T. cruzi* se ven sometidas a estrés oxidativo a lo largo del ciclo de vida del parásito. Diversas indagaciones demuestran que *T. cruzi* cuenta

con sistemas enzimáticos que le permiten sobrevivir en ambientes oxidantes. Sin embargo, éstos presentan importantes diferencias con células de mamíferos (Turrens, 2004).

2.9 Vía de reparación del DNA por escisión de bases (BER):

En eucariontes, la reparación del DNA por escisión de bases (BER) es la principal vía por la que se reparan lesiones de bases nitrogenadas que surgen posteriores a la exposición a ROS/RNS (Mandavilli *et al.*, 2002; Hegde *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Además, este mecanismo participa de la reparación de bases alquiladas y desaminadas, así como luego de eventos espontáneos de depurinación/depurimidinación del DNA. En mamíferos, se han descrito dos sub-vías de BER: la vía corta, que repara sólo el nucleótido dañado y la vía larga, que repara el nucleótido dañado más fragmentos de uno o más nucleótidos sin daño (Kumar *et al.*, 2011). Ambas vías comparten un inicio común, donde una DNA glicosilasa específica, como OGG1, detecta la base dañada y la elimina rompiendo el enlace N-glicosídico que une la base y la pentosa, generando un sitio apurínico/apirimidínico, sitio abásico o sitio AP. El residuo azúcar/fosfato remanente es reconocido por una endonucleasa apurínica/apirimidínica (endonucleasa AP) que corta el enlace 5' fosfodiéster del sitio AP, generando un extremo 3' OH libre. Este sirve como sustrato para que una DNA polimerasa incorpore el nucleótido correspondiente mediante complementariedad de bases (Robertson *et al.*, 2009). Esta acción es realizada principalmente por la DNA polimerasa β que además presenta actividad AP liasa o deoxiribosa fosfodiesterasa que permite la eliminación del remanente de azúcar/fosfato mediante un corte en el enlace 3' fosfodiéster, proceso denominado β -eliminación. Esta actividad AP liasa es realizada algunas veces por 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 δ o ϵ que se unen al antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) agregando más de un nucleótido durante la reparación del segmento. Paralelamente se genera un remanente de oligonucleótidos que se desplaza a medida que la DNA polimerasa agrega nuevos

nucleótidos. Este remanente o alerón de nucleótidos es reconocido por una Flap endonucleasa 1 (FEN1) que realiza la β -eliminación, permitiendo así que una DNA ligasa una los fragmentos de DNA y concluya la reparación del DNA (Robertson *et al.*, 2009). (Figura 2)

Actualmente, se ha detectado la presencia y actividad de algunas enzimas involucrados en la vía BER en *T. cruzi* como el de la endonucleasa AP (TcAP1), UDGas (Uracil DNA glicosilasa), PARP y la DNA glicosilasa TcOgg1 (Pérez *et al.*, 1999; Faréz-Vidal *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 1998; Furtado *et al.*, 2012; Sepúlveda *et al.*, 2013). Además, trabajos previos indican que la inhibición de la vía BER, utilizando la droga metoxiamina, está relacionado a una disminución de la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes sometidos a diferentes concentraciones de H_2O_2 y NOO^- . Estos resultados sugieren que en ambas formas celulares existe actividad relacionada con la vía BER para la reparación del DNA (Cabrera *et al.*, 2011).

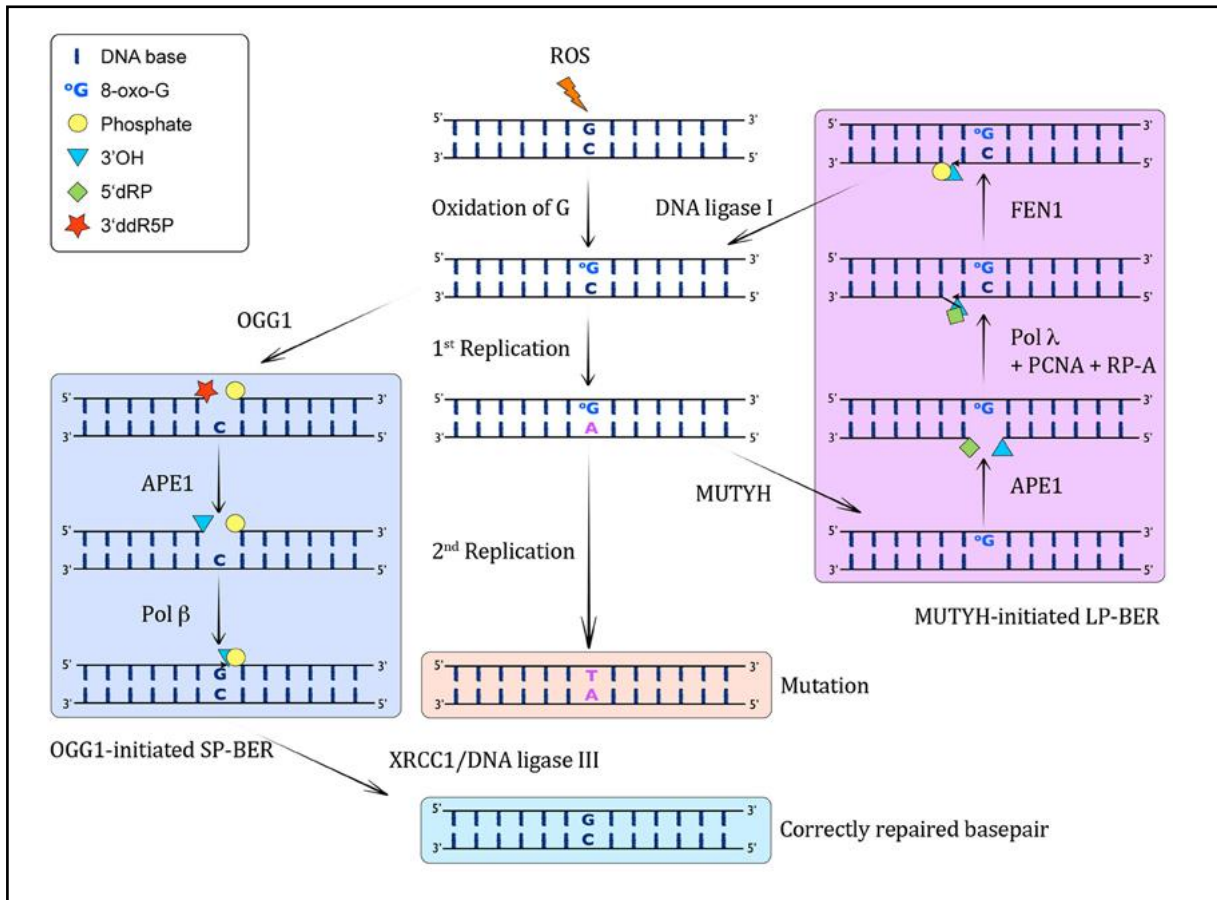


Figura 2: Vía de reparación por escisión de bases (BER). (Tomada de: Markkanen, *et al.*, 2013).

2.10 Endonucleasa APE1:

La principal endonucleasa AP de *Homo sapiens* es APE1 (HAP1, APEX o Ref1). El gen humano *ape1* codifica para una proteína α/β globular de 318 aminoácidos con una masa molecular de ~35 kDa (Illuzzi *et al.*, 2013), que al igual que su ortólogo bacteriano (exonucleasa III de *E. coli*) es una AP endonucleasa de clase II capaz de escindir el esqueleto de azúcar-fosfato en el extremo 5' de un sitio AP (Marenstein *et al.*, 2004). La localización subcelular de APE1 varía dependiendo del estado fisiológico y tipo celular, pudiéndose encontrar en citoplasma, núcleo y/o mitocondria (Kakolyris *et al.*, 1998; Mitra *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2005; Tell *et al.*, 2005).

En mamíferos, más del 95% de la actividad de procesamiento de sitios AP es realizada por APE1, desempeñando un papel central en la reparación del DNA mediante la vía BER (Marenstein *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha establecido que APE1 es esencial para la viabilidad de diferentes tipos de células eucariontes. Hasta el momento no ha sido posible obtener líneas celulares carentes de esta endonucleasa AP. La utilización de RNA de interferencia en distintas líneas celulares demostró que la disminución de la expresión de APE1 conlleva a la detención de la proliferación y un aumento de la apoptosis, asociado a una acumulación de sitios AP en el DNA (Fung y Demple, 2005). Debido a su naturaleza multifuncional, se ha establecido que APE1 es indispensable para el desarrollo embrionario normal y la supervivencia celular tanto en ratones (Xanthoudakis *et al.*, 1996) como en el pez cebra (Wang *et al.*, 2006).

Por otra parte, se demostró que la sobreexpresión de APE1 confiere resistencia a los agentes que dañan el DNA en varias líneas celulares tumorales humanas (Silber *et al.*, 2002). Por el contrario, la disminución de la expresión de APE1 utilizando RNAs de interferencia da como resultado un fenotipo hipersensible al daño del DNA, tanto en cultivos celulares como en modelos tumorales con xeno injertos (Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

Estudios relativos a cáncer describen una forma dominante-negativa de APE1 que carece de actividad AP endonucleasa y que se une con una afinidad 13 veces mayor que la proteína nativa a su sustrato (sitios AP). Esta forma mutante de APE1, denominada APE1DN, posee dos sustituciones de aminoácidos en el sitio activo de la enzima (residuos ácido glutámico 96 que cambia a glutamina y residuo ácido aspártico 210 que cambia a asparagina). Ensayos bioquímicos *in vitro* revelan que APE1DN no permite que APE1 nativa se una al sitio AP, impidiendo la remoción del azúcar-fosfato remanente, bloqueando de esta forma la vía BER. Por otra parte, células de mamífero que sobreexpresan la forma APE1DN y que son sometidas a agentes genotóxicos, presentan una elevada acumulación de sitios AP que determinan la muerte celular (McNeill y Wilson, 2007).

En *T. cruzi* se ha descrito la secuencia del gen ortólogo de *ape1* (*tcap1*) y se ha demostrado que la complementación de cepas de *E. coli* carentes de exonucleasa III (endonucleasa AP de bacterias) con el gen que codifica para la proteína TcAP1 les confiere resistencia frente a agentes oxidantes (Perez *et al.*, 1999). A su vez, estudios recientes han

establecido que la sobreexpresión de TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi* incrementa su viabilidad frente al tratamiento con H₂O₂ y NOO⁻ (Sepúlveda *et al.*, 2013). La secuencia del gen que codifica para el ortólogo de APE2 de humano, también se encuentra en *T. cruzi* (*tcap2*). Sin embargo, tanto APE2 como TcAP2 presentan una menor actividad AP endonucleasa (Burkovics *et al.*, 2006; Sepúlveda *et al.*, 2013).

Al comparar la secuencia aminoacídica de TcAP1 con APE1 de *H. sapiens* se estableció un porcentaje de similitud cercana al 30%. Si bien existen diferencias evidentes entre las secuencias aminoacídicas de ambas endonucleasas AP, los residuos aminoacídicos que conforman la región catalítica son conservados (Sepúlveda *et al.*, 2013) (Figura 3). Las divergencias observadas entre ambas proteínas son las esperadas acorde a su distancia filogenética (Galanti *et al.*, 1998). Sin embargo, las importantes diferencias que se han establecido en la localización espacial y la distancia de los residuos que conforman el sitio catalítico entre ambas enzimas (Sepúlveda, 2013), sugieren la posibilidad de diseño de posibles inhibidores específicos de TcAP1 que no afecten la actividad de APE1 de *H. sapiens*, de la misma forma como ha sido descrito entre Exo III de *E. coli* y APE1 humana (Zawahir *et al.*, 2009).

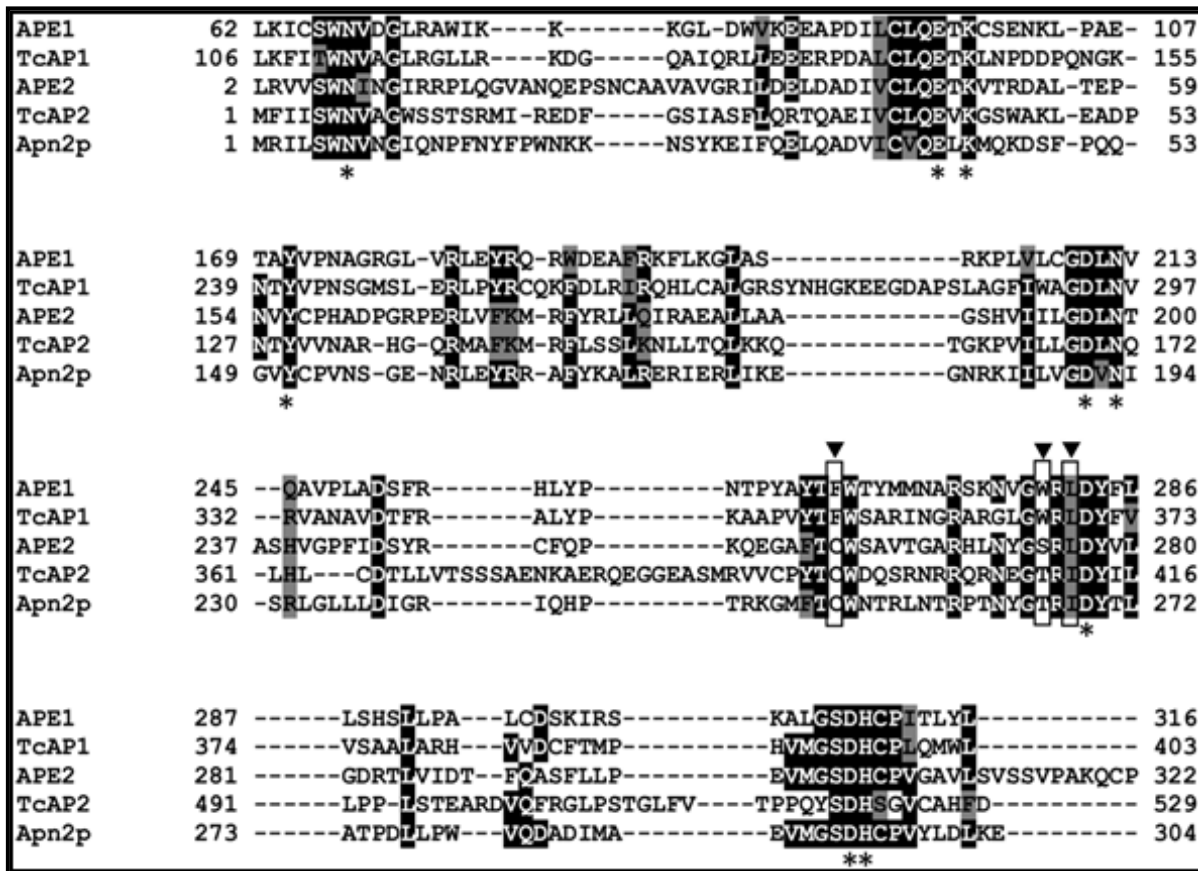


Figura 3: Alineamiento múltiple de la región catalítica de las endonucleasas AP de *Trypanosoma cruzi* (TcAP1 y TcAP2) con *Homo sapiens* (APE1 y APE2) y *Schizosaccharomyces pombe* (Apn2p). Los residuos conservados se destacan en negro (idénticos) o gris (similares). Los asteriscos muestran los residuos críticos para la unión a sitios AP y la actividad catalítica (Tomado de Sepúlveda *et al.*, 2013).

En esta Memoria de Título se estudió la sobreexpresión de formas nativas y dominantes negativos de APE1 de *Homo sapiens* en epimastigotes de *T. cruzi* y su relación con la sobrevida de parásitos sometidos a estrés oxidativo. El establecimiento de posibles similitudes y diferencias relacionadas a la actividad endonucleasa de las enzimas humanas y parasitarias, permitirán posteriormente la generación de inhibidores específicos para la enzima parasitaria. Los resultados obtenidos permitieron establecer que la expresión de APE1 humana en el parásito lo protege frente a desafíos con especies reactivas de oxígeno, mientras que la expresión de APE1DN lo hace más sensible. Por otra parte, la generación de epimastigotes recombinantes constituirá una herramienta fundamental para la búsqueda de inhibidores específicos de la vía BER de *T. cruzi*, que no afecten la actividad de APE1 de *H.*

sapiens. Estos inhibidores podrían potenciar el efecto citotóxico del daño oxidativo al DNA generado en el parásito por el sistema inmune del hospedero o por las drogas anti-chagásicas convencionales.

3- HIPÓTESIS:

La expresión de APE1 humano en epimastigotes de *T. cruzi* incrementa su viabilidad frente a daño oxidativo agudo. Por el contrario, la expresión de un dominante negativo putativo la disminuye.

4- OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto de la expresión de APE1 humana y su dominante negativo en epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a daño oxidativo.

5- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Mutar la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano para obtener la secuencia nucleotídica que codifica para un dominante negativo de APE1.

2- Localizar la ubicación subcelular de las proteínas expresadas por los plásmidos pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* en epimastigotes transfectados.

3- Evaluar la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con los plasmidios pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp*, expuestos a estrés oxidativo agudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*.

Epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) fueron cultivados a 28° C en medio Diamond (NaCl 0,106 M, KH₂PO₄ 20 mM, K₂HPO₄ 23 mM, triptosa 6,25g/L, triptona 6,25 g/L, extracto de levadura 6,25 g/L, pH 7,2) (Diamond, 1968), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), hemina 75 µM y antibióticos (penicilina 75 U/ml y estreptomicina 75 µg/ml).

2.1.2 Recuento de epimastigotes.

Epimastigotes en fase exponencial de crecimiento fueron suspendidos en 3,7% de formalina tamponada en buffer fosfato salino (PBS) y contados en cámara de Neubauer.

2.2 Inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano en el vector pMT/V5.

2.2.1 Obtención del constructo pMT/V5-*ape1*

Con el objetivo de insertar la secuencia nucleotídica codificante del gen *ape1* en un plasmidio con escaso número de nucleótidos, que facilite la posterior mutación sitio dirigida de la secuencia para la enzima, se utilizó el vector pMT/V5 (Invitrogen) que sólo presenta 3.538 pb.

La secuencia nucleotídica codificante de APE1 fue amplificada desde cDNA de *H. sapiens*. El cDNA molde fue generado, a partir de extracto de RNA total de células HEK293T “human embryonic kidney” mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR), utilizando partidores con sitios de restricción para las enzimas *Kpn* I (en rojo) y *Age* I (en azul):

APE1 sentido: GGGGTACCGCAATGGGAATGCCGAAGCGTGGGAAAAAGGGA

APE1 antisentido: CACACCGGTCAGTGCTAGGTATAGGGTGATAGGA

La visualización de los fragmentos obtenidos se realizó mediante geles de agarosa al 1% P/V, teñidos con GelRed (Biotium). Los amplificadores de *ape1* fueron purificados desde estos geles utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. (Con controles respectivos para *ape*, ver resultados)

Los fragmentos nucleotídicos amplificados y purificados del gen *ape1* y el vector pMT/V5 fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción mencionadas y ligadas con DNA ligasa T4 (Promega). Los constructos obtenidos se electroporaron en bacterias *E. coli* cepa JM109. La selección de clones positivos se realizó mediante la técnica de PCR de colonias.

2.2.2 Generación del constructo pMT/V5-*ape1DN*.

Tal como se mencionó previamente, estudios realizados por McNeill y Wilson (2007) describen una forma dominante negativa de APE1 que posee dos sustituciones de aminoácidos en el sitio activo de la enzima (residuos ácido glutámico 96 que cambia a glutamina y residuo ácido aspártico 210 que cambia a asparragina). Basados en estos resultados, se diseñaron oligonucleótidos partidores que generaran mutaciones E-Q (ácido glutámico por glutamina) y D-N (ácido aspártico por asparragina) en la proteína APE1. En rojo se muestra el nucleótido a mutar y en azul el triplete al que corresponde:

APE1(E-Q) sentido: CCAGATATACTGTGCCTTCAAACAGACCAAATGTTTCAGAG

APE1(E-Q) antisentido: CTCTGAACATTTGGTCTGTTGAAGGCACAGTATATCTGG

APE1(D-N) sentido: GCCCCTTGTGCTGTGTGGAACCTCAATGTGGCACATGA

APE1(D-N) antisentido: TCATGTGCCACATTGAGGTTTCCACACAGCACAAGGGGC

La mutación de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 para la generación del dominante negativo se realizó utilizando los oligonucleótidos partidores mencionados y el kit QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), utilizando como DNA molde el plasmidio pMT/V5-*ape1* generado previamente en 3.2.1.

Como se mencionó, se utilizó dicho constructo por tener un menor número de nucleótidos comparado con otros plasmidios obtenidos durante la ejecución de esta Memoria de Título (como pTREX-*his8-ape1-gfp*), lo que incrementa las probabilidades de éxito de la técnica. Cabe señalar que el DNA plasmidial pMT/V5-*ape1* fue purificado desde bacterias JM109 que presentan actividad adenina metiltransferasa (Dam+) capaz de agregar grupos metilos a adeninas presentes en secuencias GATC, necesarias para la aplicación del kit de mutagénesis sitio-dirigida. En primer lugar se generó la mutación nucleotídica que permite modificar el residuo 210 (ácido aspártico por asparragina) y luego la mutación nucleotídica que permite modificar el residuo 96 (ácido glutámico por glutamina).

La técnica de mutagénesis sitio dirigida utilizando este kit constó de 3 pasos fundamentales:

- a) En una primera instancia se aplicaron ciclos termales sobre una reacción que contenía una DNA polimerasa de alta fidelidad (Pfu), un par de partidores con los sitios a mutar y DNA molde (pMT/V5-*ape1*) metilado en GATC. Los ciclos termales fueron: 5 minutos de denaturación a 95°C, seguidos de 16 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C y 5 minutos a 68°C.
- b) El producto amplificado fue incubado con la enzima *Dpn* I con el objetivo de degradar el DNA molde y conservar los plasmidios amplificados que presentan las secuencias mutadas.
- c) Finalmente el producto resultante fue transformado en bacterias XL1-blue para sellar los cortes y amplificar el plasmidio mutado.

Cada plasmidio mutado fue purificado y sometido a secuenciación automática de DNA para corroborar la presencia de la mutación deseada.

2.3.1 Clonamiento e inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano en el vector de expresión pTREX-*his8-gfp*.

La secuencia nucleotídica codificante de APE1 fue amplificada desde cDNA de *H. sapiens* mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR), utilizando partidores con sitios de restricción para la enzima *Hind* III (en azul):

APE1 sentido: GCAAGCTTATGCCGAAGCGTCGGAAAAAG

APE1 antisentido: CCCAAGCTTCAGTGCTAGGTATAGGGTGATA

El cDNA molde fue generado previamente en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del ICBM, a partir de extracto de RNA total de células HEK293T “human embryonic kidney”.

La visualización de los fragmentos obtenidos se realizó mediante geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRed (Biotium). Los amplificados de APE1 fueron purificados desde estos geles utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, los fragmentos nucleotídicos amplificados y purificados del gen APE1 y el vector de expresión pTREX-*his8-gfp* fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción previamente mencionadas durante toda la noche a 37°C. El vector pTREX-*his8-gfp* genera una proteína de fusión con 8 histidinas en el extremo amino terminal y la proteína fluorescente verde en el extremo carboxilo terminal. Para la ligación del producto de PCR de APE1 en el vector de expresión pTREX-*his8-gfp* se realizó una incubación con DNA ligasa T4 (Promega) durante toda la noche a 4°C.

Los constructos obtenidos se electroporaron en bacterias *E. coli* cepa JM109 electrocompetentes y se cultivaron en placas Petri con medio LB agar y ampicilina. La selección de clones positivos se realizó mediante la técnica de PCR de colonias. Posteriormente, se purificó el constructo desde las colonias positivas utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep® (QIAGEN), según instrucciones del fabricante. Finalmente, se evaluó la presencia del inserto en el vector mediante digestión enzimática del constructo purificado y por secuenciación automática de DNA.

2.3.2 Generación del vector de expresión pTREX-*his8-ape1DN-gfp*

El plasmidio pTREX-*his8-ape1DN-gfp* se generó de la misma manera que el plasmidio pTREX-*his8-ape1-gfp* (descrito en 3.3.1) utilizando como DNA molde el plasmidio pMT/V5-*ape1DN* obtenido en 3.2.2.

2.4. Transfección de epimastigotes con los plasmidios pTREX-*his8-gfp* (vector vacío control), pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp*

Epimastigotes del clon Dm28c se transfectaron con los plasmidios pTREX-*his8-gfp* (control), pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* de manera independiente. Para tales propósitos, epimastigotes en fase exponencial de crecimiento se contaron en cámara de Neubauer y se lavaron una vez en PBS estéril. Los parásitos se resuspendieron en medio de electroporación (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ a pH 7,6) a una concentración de 1x10⁸ parásitos/ml. Posteriormente, 400 µl de epimastigotes resuspendidos, fueron incubados con 90 µg de cada plasmidio medido espectrofotométricamente y, de manera independiente se electroporaron 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) y se incubaron 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 visualización de la expresión de las proteínas HIS8-GFP (control), HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP en epimastigotes transfectados se realizó por *western blot* y mediante observación de los epimastigotes transfectados con un microscopio de fluorescencia.

2.5. Determinación de la expresión de las proteínas HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP mediante ensayos de *western blot*.

Homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-*his8-gfp*, pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* fueron separados electroforéticamente en geles SDS-PAGE al 10%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) 5% en PBS durante 2 horas a 37°C, lavadas 3 veces con PBS-Tween 0.05% v/v e incubadas con un anticuerpo primario policlonal anti-GFP (Thermo Scientific) en una dilución 1:6000 v/v en PBS-Tween 0.05% y con un anticuerpo primario monoclonal anti-APE1 en una dilución 1:2000 v/v en PBS-Tween 0.05% durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución 1:10000 v/v en PBS-Tween 0.05% durante 1 hr a temperatura ambiente. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific).

2.6. Localización subcelular de las proteínas recombinantes HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP expresadas en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados.

La localización subcelular de HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP en epimastigotes transfectados (ver 3.4) se realizó por fluorescencia y mediante inmunodetección de la proteína GFP en parásitos fijados con metanol 70% frío durante 30 minutos. Para esto, las muestras fijadas fueron tratadas con solución de bloqueo (BSA 1%, saponina 0,1 %v/v, suero de ternero 3% v/v en PBS) durante 2 horas a 37°C e incubadas con un anticuerpo primario policlonal de ratón anti-GFP (Thermo Scientific) en una dilución 1:100 v/v en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los extendidos fueron lavados con PBS e incubados con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) en una dilución 1:300 v/v en solución de bloqueo. Finalmente, las muestras fueron sometidas a contra-tinción nuclear con DAPI, montadas y visualizadas en un microscopio de fluorescencia. Las fotografías fueron

obtenidas con filtro 430 ± 20 nm para evidenciar fluorescencia azul (DAPI) y con filtro 520 ± 20 nm, que permite la identificación de fluorescencia verde (Alexa fluor 488). Las fotografías fueron procesadas computacionalmente para determinar la sobreposición de DAPI (utilizando pseudo color rojo) con Alexa fluor 488 (verde).

2.7. Determinación de la viabilidad de epimastigotes recombinantes expuestos a estrés oxidativo agudo

2.7.1 Exposición de epimastigotes recombinantes a estrés oxidativo agudo

Epimastigotes transfectados, expresando las proteínas HIS8-GFP (como control), HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP (12×10^6 parásitos/ml) fueron expuestos a diferentes concentraciones de H_2O_2 durante 30 minutos a $28^\circ C$. Posteriormente, fueron incubados durante 4 horas en medio fresco para permitir su recuperación (reparación del DNA). Luego de este tiempo se determinó la viabilidad de los parásitos mediante ensayos de MTT.

2.7.2 Ensayo de MTT:

La viabilidad de los parásitos fue determinada a través del ensayo colorimétrico MTT. Este ensayo mide actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, la que cataliza la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), de color amarillo, a formazán, un precipitado de color púrpura. La cantidad de parásitos vivos es proporcional a la cantidad de formazán producida. Los epimastigotes expuestos a estrés oxidativo (descrito en 3.7.1) fueron incubados en placas de 96 pocillos en presencia del reactivo MTT durante 4hrs a $28^\circ C$. Posteriormente, el precipitado generado se solubilizó utilizando una solución de SDS 10% y 0,01 M HCl. Se incubó durante 30 min a $37^\circ C$ y su absorbancia fue cuantificada en un lector de microplacas a 570nm.

2.8. Objetivo extra: Obtención de la proteína HIS8-APE1DN-GFP

Se obtuvieron parásitos suficientes (12×10^6 parásitos/ml) para obtener una cantidad de proteína que permitiera realizar posteriormente diferentes ensayos bioquímicos, como los de funcionalidad enzimática. Posteriormente, las células fueron centrifugadas 10 minutos a 2.000 xg a temperatura ambiente suspendidas en 5 ml de amortiguador de lisis para purificación de proteínas (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8,0, Tritón X-100 1%, glicerol 10%) e incubadas durante 30 minutos con agitación a 4° C. Luego las muestras se sonicaron durante 1 minuto en hielo. El lisado resultante fue centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante, conteniendo la proteína de interés, fue transferido a una columna de agarosa-níquel la que posteriormente fue lavada con 20 ml de buffer de lavado (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 8,0, Tritón X-100 1%, glicerol 10%). La elución de la proteína recombinante APE1DN se realizó utilizando 10ml de buffer de elución (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, imidazol 300 mM, pH 8,0, Tritón X-100 1%, glicerol 10%) tomando alícuotas secuenciales de 500 μ l. Finalmente, se detectó la presencia de HIS8-APE1DN-GFP recombinante mediante ensayos de *western blot* utilizando los anticuerpos anti-GFP y anti-APE1 (dilución 1:2000 v/v).

2.9. Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos en cada experimento fueron analizados estadísticamente con el software GraphPad Prism versión 5. En todos los casos los resultados representan el promedio de 3 experimentos \pm el error estándar de la media. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones, a fin de determinar diferencias significativas.

2.10 Bioseguridad:

Los experimentos previamente descritos fueron realizados en el laboratorio bajo las normas establecidas por la Unidad de Riesgo y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se trabajó con la forma celular no infectiva del parásito (epimastigote) en una campana de flujo laminar clase II tipo A.

3. RESULTADOS.

3.1 Inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano en el vector pMT/V5

La secuencia nucleotídica codificante para la proteína APE1 humana fue amplificada utilizando cDNA de *H. sapiens* como DNA molde, mediante ensayos de PCR obteniendo una banda de aproximadamente 957 pb (Figura 4), que corresponde al tamaño esperado para APE1.

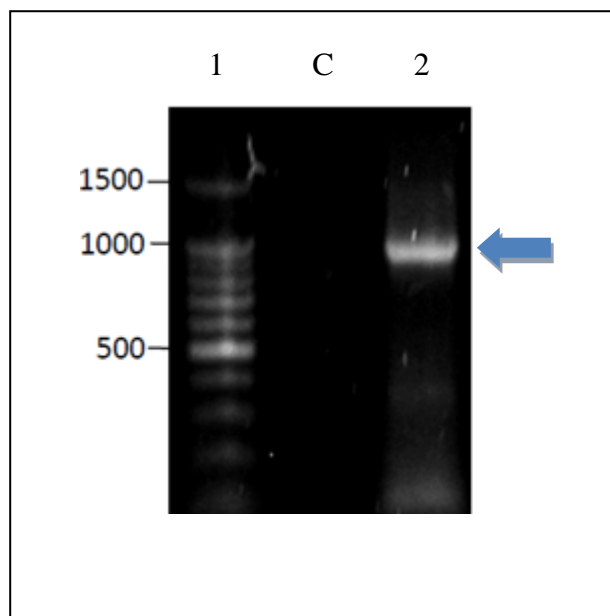


Figura 4: Amplificación del fragmento codificante de la endonucleasa APE1 de *H. sapiens*: Separación electroforética de fragmentos de DNA obtenidos por PCR. 1) marcador de pares de bases, 2) amplificado de APE1 utilizando cDNA de *H. sapiens*, como DNA molde (aproximadamente 957 pb) ← C: PCR sin DNA molde

El producto amplificado fue digerido con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Age* I e insertado en el vector pMT/V5 Finalmente el constructo fue analizado mediante secuenciación automática de DNA (Figura 5), mostrando un 96% de homología con secuencias anotadas en bases de datos para la secuencia codificante de la proteína APE1.

```

ape1          -----ATGCCGAAGCGTGGGAAAAAGGGAGCGGTGG
pMT/V5-ape1  TGGAACGGGTCTGACGGGTCCGCATGGGATGCCTACACGTGGGAAAAAGGGAGCGGTGG
                ***** * *****

ape1          CGGAAGACGGGGATGAGCTCAGGACAGAGCCAGAGCCAAGAAGAGTAAGACGGCCGCAA
pMT/V5-ape1  CGGAAGATGGGGATGAGCTCAGGACAGAGCCAGAGCCAAGAAGAGTAAGACGGCCGCAA
                ***** *****

ape1          AGAAAAATGACAAAGAGGCAGCAGGAGAGGGCCAGCCCTGTATGAGGACCCCCAGATC
pMT/V5-ape1  AGAAAAATGACAAAGAGGCAGCAGGAGAGGGCCAGCCCTGTATGAGGACCCCCAGATC
                ***** *****

ape1          AGAAAACCTCACCCAGTGGCAAACCTGCCACACTCAAGATCTGCTCTTGGAAATGTGGATG
pMT/V5-ape1  AGAAAACCTCACCCAGTGGCAAACCTGCCACACTCAAGATCTGCTCTTGGAAATGTGGATG
                ***** *****

ape1          GGCTTCGAGCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAGAAGCCCCAGATA
pMT/V5-ape1  GGCTTCGAGCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAGAAGCCCCAGATA
                ***** *****

ape1          TACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATGTTTCAGAGAACAACCTACCAGCTGAACTTCAGGAGC
pMT/V5-ape1  TACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATGTTTCAGAGAACAACCTACCAGCTGAACTTCAGGAGC
                ***** *****

ape1          TGCCTGGACTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAGGGTACAGTGGCG
pMT/V5-ape1  TGCCTGGACTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAGGGTACAGTGGCG
                ***** *****

```

Figura 5: Alineamiento entre secuencias nucleotídicas de *ape1* y *pMT/V5-ape1*: Los residuos con (*) corresponden a nucleótidos idénticos entre ambas secuencias. Realizado mediante el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

3.2. Mutación de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humano para obtener la secuencia nucleotídica que codifica para un dominante negativo de APE1

La mutación de la secuencia nucleotídica de la endonucleasa APE1 (homóloga humana de TcAP1) permitió a los investigadores McNeill y Wilson (McNeill and Wilson, 2007) generar un dominante negativo de ésta proteína. Basándonos en estos estudios, se identificaron los residuos modificados en APE1DN (E96 y D210) los que corresponden a ácido glutámico y ácido aspártico. Se diseñaron partidores nucleotídicos específicos para cada mutación, que determinan cambios en los residuos aminoacídicos (ácido aspártico por asparragina (D-N) y ácido glutámico por glutamina (E-Q)). Utilizando un kit de mutagénesis sitio dirigida y como DNA molde el plasmidio pMT/V5-*ape1* obtenido previamente (ver 4.1), se introdujo en primer lugar la mutación D-N (ácido aspártico por asparragina). Dichos amplificados fueron transformados en bacterias *E. coli* y se realizó un ensayo de PCR de colonias para corroborar la inserción del fragmento mutado en el vector, obteniéndose un amplificado cercano a 957 pb (Figura 6). La presencia de la mutación en los plasmidios fue corroborada mediante secuenciación automática de DNA, mostrando los cambios esperados en los codones correspondientes (Figura 7, secuenciación primera mutación de ácido aspártico por asparragina D-N (GAC→AAC)). Luego, utilizando como DNA molde los plasmidios mutados para el cambio ácido aspártico por asparragina (D-N) se realizó la segunda mutación E-Q (ácido glutámico por glutamina), la cual también fue transformada en bacterias *E. coli* (Figura 8). Cada plasmidio mutado fue secuenciado automáticamente, mostrándose los cambios esperados en los codones correspondientes (Figura 9, secuenciación automática mutación ácido glutámico por glutamina E-Q (GAG→CAG)).

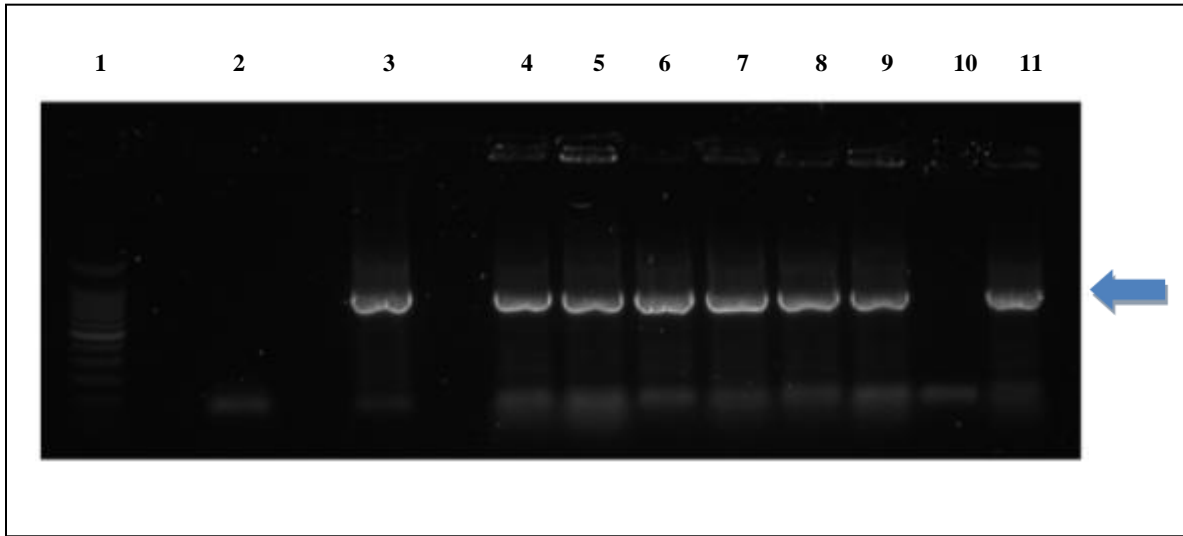


Figura 6: Amplificación del fragmento de DNA codificante de APE1 que genera la mutación DN en diferentes colonias de bacterias *E. coli* transformadas. Carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2) control sin DNA; Carril 3) control positivo (DNA genómico de *H. sapiens*); Carriles 4 al 11, amplificados de DNA codificante para mutación DN utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas con el constructo pMT/V5-DN; tamaño esperado del amplificado de 957 pb ←


```

ape1      AATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGC
ape1 (D-N) AATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGC
*****

ape1      AAGTTCCTGAAGGGCCTGGCTTCCCGAAAGCCCCCTGTGCTGTGTGGA CACTCAATGTG
ape1 (D-N) AAGTTCCTGAAGGGCCTGGCTTCCCGAAAGCCCCCTGTGCTGTGTGGA CACTCAATGTG
*****

ape1      GCACATGAAGAAATTGACCTTCGCAACCCCAAGGGGAACAAAAGAATGCTGGCTTCACG
ape1 (D-N) GCACATGAAGAAATTGACCTTCGCAACCCCAAGGGGAACAAAAGAATGCTGGCTTCACG
*****

ape1      CCACAAGAGCGCCAAGGCTTCGGGGAATTACTGCAGGCTGTGCCACTGGCTGACAGCTTT
ape1 (D-N) CCACAAGAGCGCCAAGGCTTCGGGGAATTACTGCAGGCTGTGCCACTGGCTGACAGCTTT
*****

ape1      AGGCACCTCTACCCCAACACACCCTATGCCTACACCTTTTGGACTTATATGATGAATGCT
ape1 (D-N) AGGCACCTCTACCCCAACACACCCTACGCCTACACCTTTTGGACTTATATGATGAATGCT
*****

ape1      CGATCCAAGAAATGTTGGTTGGCGCCTTGATTACTTTTTGTTGTCCCACTCTCTGTTACCT
ape1 (D-N) CGATCCAAGAAATGTTGGTTGGCGCCTTGATTACTTTTTGTTGTCCCACTCTCTGTTACCT
*****

```

Figura 7: Alineamiento entre secuencias nucleotídicas de *ape1* y pMT/V5-*ape1* mutación D-N (Obtenido mediante secuenciación automática) Los residuos en rojo corresponden a codones mutados (ácido aspártico por asparragina) y los residuos en negro corresponden a nucleótidos idénticos entre ambas secuencias (*). Realizado mediante el programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

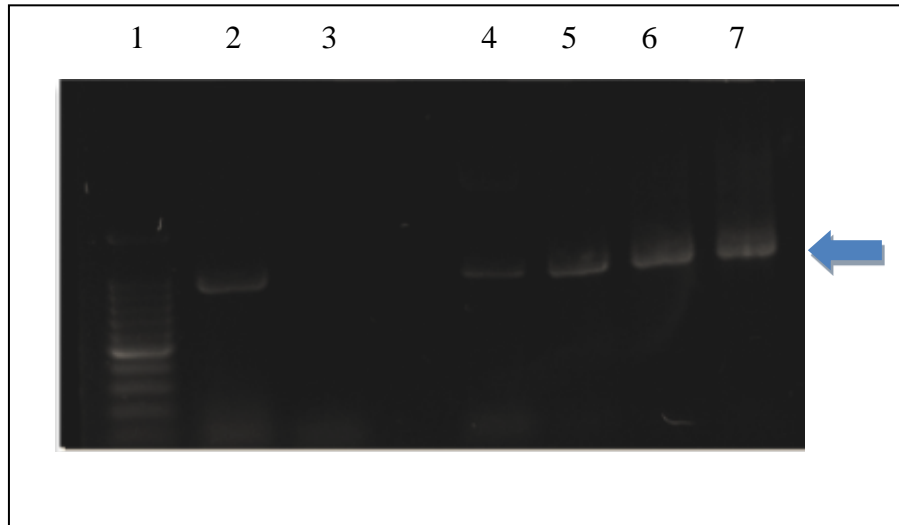


Figura 8: Amplificación del fragmento de DNA codificante de APE1 que genera la mutación D-N y E-Q en diferentes colonias de bacterias *E. coli* transformadas. Carril 1) marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2: control positivo (DNA genómico de *H. sapiens*); carril 3) control sin DNA; Carriles 4 al 7, amplificados de DNA codificante para mutación D-N y E-Q utilizando lisados de diferentes colonias bacterianas transformadas con el constructo pMT/V5-DN-EQ; tamaño esperado del amplificado de 957 pb ←

```

ape1          GCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAGAAGCCCCAGATATACTGTGC
ape1 (E-Q)    GCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAGAAGCCCCAGATATACTGTGC
*****

ape1          CTTGAGAGACCAAATGTTTCAGAGAACAACCTACCAGCTGAACTTCAGGAGCTGCCTGGA
ape1 (E-Q)    CTTCAAAGAGACCAAATGTTTCAGAGAACAACCTACCAGCTGAACTTCAGGAGCTGCCTGGA
***.*****

ape1          CTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAGGGTACAGTGGCGTGGGCCTG
ape1 (E-Q)    CTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAGGGTACAGTGGCGTGGGCCTG
*****

ape1          CTTTCCCGCCAGTGCCCACTCAAAGTTTCTTACGGCATAGGCGAGGAGCATGATCAG
ape1 (E-Q)    CTTTCCCGCCAGTGCCCACTCAAAGTTTCTTACGGCATAGGCGATGAGGAGCACGATCAG
*****

ape1          GAAGGCCGGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTTGTGCTGGTAACAGCATATGTACCT
ape1 (E-Q)    GAAGGCCGGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTTGTGCTGGTAACTGCATATGTACCT
*****

ape1          AATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGC
ape1 (E-Q)    AATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGC
*****

```

Figura 9: Alineamiento entre secuencias nucleotídicas de *ape1* y pMT/V5-*ape1* mutación E-Q (Obtenido mediante secuenciación automática). Los residuos en rojo corresponden a codones mutados (ácido glutámico por glutamina) y los residuos en negro corresponden a nucleótidos idénticos entre ambas secuencias (*). Realizado mediante el programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

3.3 Inserción de la secuencia nucleotídica codificante de APE1 y APE1DN humano en el vector de expresión para *T. cruzi* pTREX-*his8-gfp*

Se amplificó, mediante PCR, la secuencia nucleotídica codificante de APE1 humana utilizando cDNA de células HEK293T como DNA molde y se obtuvo un fragmento cercano a las 957 pb. Paralelamente se amplificó mediante PCR la secuencia nucleotídica codificante de APE1DN utilizando como DNA molde el plasmidio pMT/V5-*ape1DN* generado previamente (ver 4.2). Para tales efectos se diseñaron oligonucleótidos partidores específicos con sitios de restricción para la enzima *Hind* III. Posteriormente, ambos amplificados fueron purificados desde geles de agarosa e incubados con dicha enzima de restricción, al igual que el vector pTREX-*his8-gfp* de *T. cruzi*. Los productos de PCR cortados fueron ligados en el vector incubando con la enzima ligasa T4, para finalmente ser electroporados en bacterias *E. coli* JM109, las que fueron sembradas en placas de LB-agar con ampicilina. La selección de clones positivos se realizó mediante la técnica de PCR de colonias, obteniéndose 4 clones positivos para *ape1* (Figura 10) y 3 clones positivos para *ape1DN* (no mostrado).

Los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* fueron purificados desde un clon de bacterias *E. coli* positivas para cada vector con el objetivo de evaluar nuevamente la presencia de los insertos en el plasmidio. Esto último fue corroborado mediante ensayos de digestión durante 5 horas a 37°C con la enzima *Hind* III. Ambas digestiones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con GelRed, con el propósito de observar la liberación de los fragmentos del tamaño esperado de 957 pb (Figura 11). Finalmente, los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* fueron sometidos a secuenciación automática de DNA para comprobar la integridad y correcto marco de lectura de ambas secuencias (Figura 12).

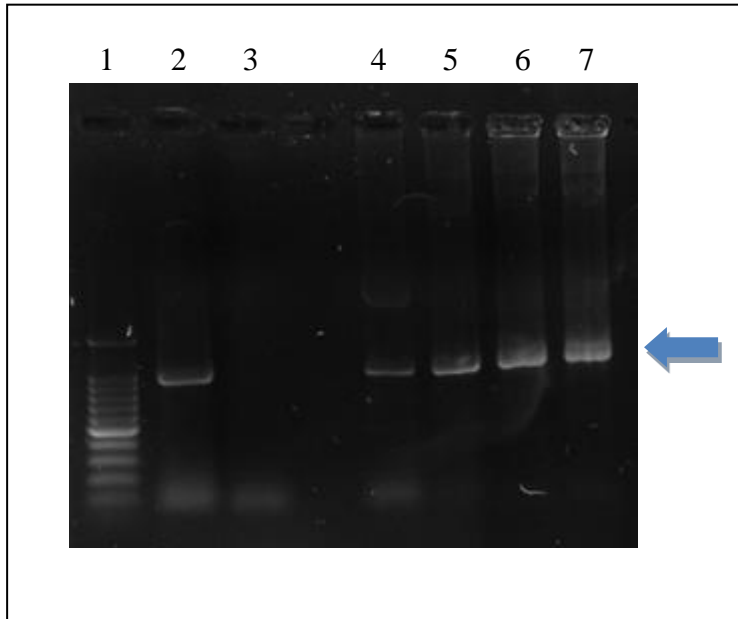


Figura 10: Comprobación mediante PCR de la presencia de la secuencia codificante de APE1 humano en colonias de *E. coli* transformadas con el constructo pTREX-*his8-ape1-gfp*. Carril 1) marcador de pares de bases (100 pb), Carril 2) control positivo utilizando APE1 secuenciado como templado. Carril 3) control negativo, PCR sin DNA. Los carriles 4 a7 corresponden a los productos de 957 pb aproximadamente. ←

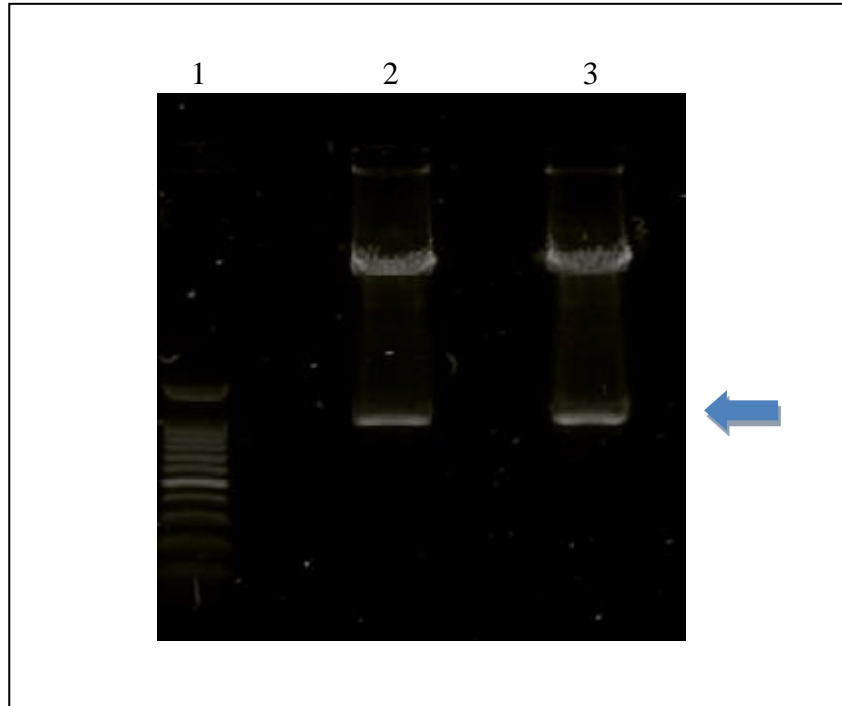


Figura 11: Identificación mediante digestión enzimática de la presencia de los insertos *ape1* y *ape1DN* en los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* purificados desde colonias de *E. coli* positivas. Carril 1) marcador de pares de bases (100 pb). Carriles 2 y 3 corresponden a los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp*, respectivamente incubados con la enzima de restricción *Hind* III liberando un fragmento de aproximadamente 957 pb. ←

```

ape1      AGGGAGCGGTGGCGGAAGACGGGGATGAGCTCAGGACAGAGCCAGAGGCCAAGAAGAGTA
pTREX-his8-ape1DN-gfp AGGGAGCGGTGGCGGAAGATGGGGATGAGCTCAGGACAGAGCCAGAGGCCAAGAAGAGTA
*****

ape1      AGACGGCCGCAAAAGAAAATGACAAAGAGGCAGCAGGAGAGGGCCAGCCCTGTATGAGG
pTREX-his8-ape1DN-gfp AGACGGCCGCAAAAGAAAATGACAAAGAGGCAGCAGGAGAGGGCCAGCCCTGTATGAGG
*****

ape1      ACCCCCAGATCAGAAAACCTCACCCAGTGGCAAACCTGCCACACTCAAGATCTGCTCTT
pTREX-his8-ape1DN-gfp ACCCCCAGATCAGAAAACCTCACCCAGTGGCAAACCTGCCACACTCAAGATCTGCTCTT
*****

ape1      GGAATGTGGATGGGCTTCGAGCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAG
pTREX-his8-ape1DN-gfp GGAATGTGGATGGGCTTCGAGCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTAAAGGAAG
*****

ape1      AAGCCCAGATATACTGTGCCCTCAAAGACCAAATGTTTCAGAGAACAAACTACCAGCTG
pTREX-his8-ape1DN-gfp AAGCCCAGATATACTGTGCCCTCAAAGACCAAATGTTTCAGAGAACAAACTACCAGCTG
*****

ape1      AACTTCAGGAGCTGCCTGGACTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAG
pTREX-his8-ape1DN-gfp AACTTCAGGAGCTGCCTGGACTCTCTCATCAATACTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAG
*****

ape1      GGTACAGTGGCTGGGCTGCTTCCCGCCAGTGCCCACTCAAAGTTTCTTACGGCATAG
pTREX-his8-ape1DN-gfp GGTACAGTGGCTGGGCTGCTTCCCGCCAGTGCCCACTCAAAGTTTCTTACGGCATAG
*****

ape1      GCGAGGAGGAGCATGATCAGGAAGGCCGGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTTGTGC
pTREX-his8-ape1DN-gfp GCGATGAGGAGCAGCATGATCAGGAAGGCCGGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTTGTGC
****

ape1      TGGTAACAGCATATGTACCTAATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGC
pTREX-his8-ape1DN-gfp TGGTAACAGCATATGTACCTAATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGCAGC
*****

ape1      GCTGGGATGAAGCCTTTCGCAAGTTCCTGAAGGGCCTGGCTTCCCGAAAGCCCTTGTGC
pTREX-his8-ape1DN-gfp GCTGGGATGAAGCCTTTCGCAAGTTCCTGAAGGGCCTGGCTTCCCGAAAGCCCTTGTGC
*****

ape1      TGTGTGGAAGCTCAATGTGGCACATGAAGAAATTGACCTTCGCAACCCCAAGGGGAACA
pTREX-his8-ape1DN-gfp TGTGTGGAAGCTCAATGTGGCACATGAAGAAATTGACCTTCGCAACCCCAAGGGGAACA
*****

ape1      AAAAGAATGCTGGCTTCACGCCACAAGAGCGCCAAGGCTTCGGGAATTACTGCAGGCTG
pTREX-his8-ape1DN-gfp AAAAGAATGCTGGCTTCACGCCACAAGAGCGCCAAGGCTTCGGGAATTACTGCAGGCTG
*****

```

Figura 12: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica codificante para APE1 humana con el producto de la secuenciación automática del constructo pTREX-his8-ape1DN-gfp. Se muestra además el cambio de nucleótidos esperados, GAG → CAG (Ac. glutámico → glutamina), GAC → AAC (Ac. aspártico → asparragina). Los residuos con (*) corresponden a nucleótidos idénticos entre ambas secuencias. Alineamiento realizado utilizando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

3.4 Transfección de epimastigotes de *T. cruzi* con los plasmidios pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* y evaluación de la expresión de las proteínas

Los constructos pTREX-*gfp*, pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* fueron transfectados mediante electroporación en epimastigotes de *T. cruzi*. La selección de las células transfectadas se realizó incubando los parásitos con el antibiótico G-418 (neomicina) durante 3 a 4 semanas.

Para detectar la expresión del vector vacío (sólo la proteína HIS8-GFP) y de las proteínas recombinantes HIS8-APE1-GFP y HIS-8APE1DN-GFP en los epimastigotes transfectados, se prepararon homogeneizados de estos parásitos y las proteínas fueron separadas por electroforesis. Después de transferirlas a membranas de nitrocelulosa, las proteínas expresadas por los tres parásitos transfectados con cada constructo fueron desafiadas con un anticuerpo monoclonal anti-APE1 (Figura 13A) y un anticuerpo policlonal anti-GFP (Figura 14B). Las proteínas expresadas por el vector vacío no fueron reconocidas por el anticuerpo anti-APE1 (Figura 13A, carril 1), [salvo una señal inespecífica de 64 kDa]. Sin embargo, el anticuerpo anti-GFP reconoce la proteína verde fluorescente (Figura 13B, carril 1, punta de flecha), como era esperable. El anticuerpo anti-APE1 reconoce las proteínas de expresión producto de la transfección de epimastigotes con los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* (Figura 14A, carril 2, flecha) y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* (Figura 13A, carril 3, flecha). El anticuerpo anti-GFP también reconoce las mismas proteínas recombinantes (Figura 13B, carriles 2 y 3, flecha). Si bien ambas proteínas presentan una masa molecular mayor a la esperada (82 kDa vs 66 kDa, suma de las masas de GFP y de APE1), el hecho que sean reconocidas tanto por el anticuerpo anti-GFP y el anticuerpo anti-APE1, es una señal inequívoca de que se trata de la proteína de fusión esperada.

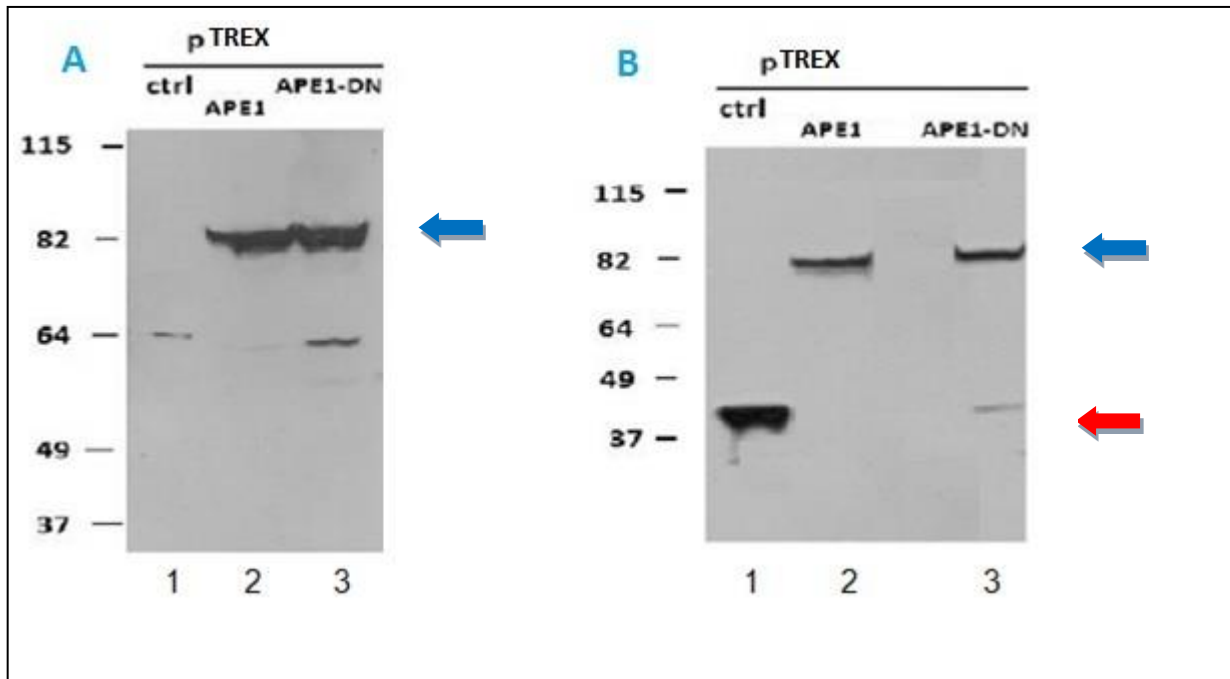


Figura 13: Detección de las proteínas expresadas por el vector vacío pTREX-*gfp* (control, A y B, carril 1) y por los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* (A y B, carril 2) y pTREX-*his8-ape1DN-gfp* (A y B, carril 3) en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados. En A se empleó anticuerpo anti-APE1 mientras que en B las proteínas se detectaron empleando un anticuerpo anti-GFP: ← APE1 (carril 2) y APE1DN (carril 3). : GFP ←

3.5 Analisis de la localización subcelular de las proteínas expresadas por los plásmidos *pTREX-his8-ape1-gfp* y *pTREX-his8-ape1DN-gfp* en epimastigotes transfectados.

Se prepararon extendidos de parásitos transfectados en portaobjetos y se observaron con un microscopio de fluorescencia. Los epimastigotes transfectados con el vector *pTREX-his8-gfp* vacío muestran fluorescencia verde homogénea en el citoplasma y a lo largo del flagelo (Figura 14, D). Por el contrario, los epimastigotes transfectados con el constructo *pTREX-his8-ape1-gfp* muestran localización de la enzima circunscrita a sólo un área del parásito (Figura 14, E) mientras que en los parásitos transfectados con el constructo *pTREX-his8-ape1DN-gfp* la proteína recombinante se encuentra principalmente localizada en un área pero hay una señal clara, aunque tenue, en un área más extensa, que podría ser el citoplasma del paracitario (Figura 14, F).

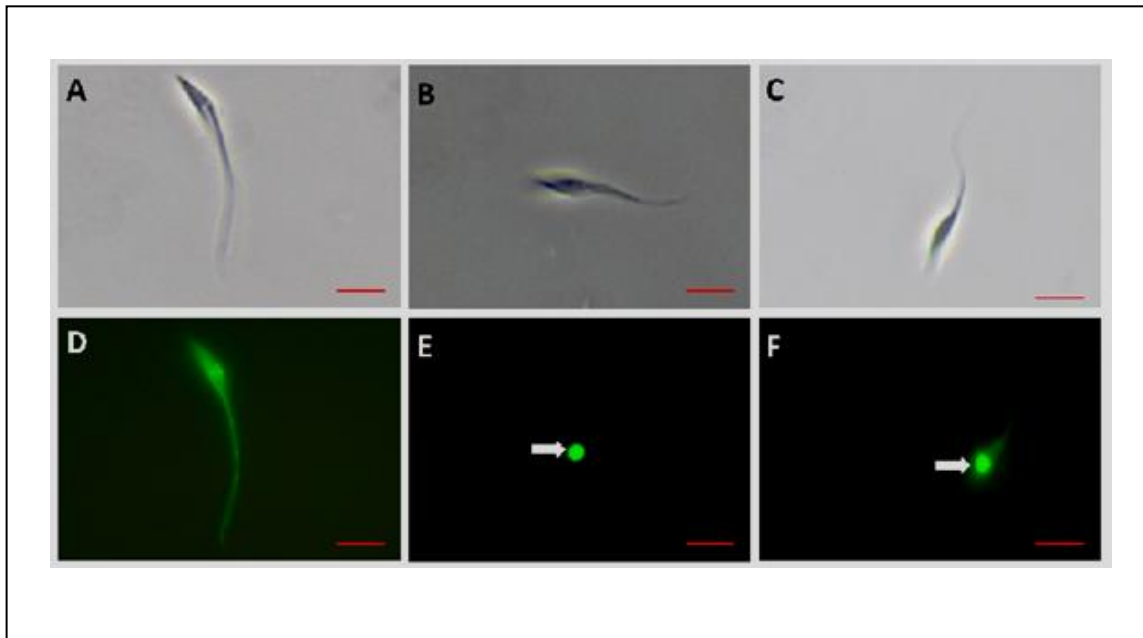


Figura 14: Localización subcelular de HIS8-APE1-GFP y de HIS8-APE1DN-GFP en epimastigotes de *T. cruzi*: Epimastigotes transfectados con el plasmidio vacío pTREX-*his8-gfp* (A y D) y con los plasmidios pTREX-*his8-ape1-gfp* (B y E) o pTREX-*his8-ape1DN-gfp* (C y F) se suspendieron en glicerol al 70% y se observaron en un microscopio de fluorescencia. El vector vacío muestra distribución de la fluorescencia en toda la célula (D); HIS8-APE1-GFP se encuentra localizado en una zona, que podría ser el núcleo (E) mientras que HIS8-APE1DN-GFP se encuentra en lo que podría ser núcleo y en citoplasma (F). A, B y C: contraste de fase; D, E y F: fluorescencia. Flechas → núcleos. Barra 10µm.

Con el objeto de corroborar la localización subcelular de HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP se detectaron ambas proteínas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal anti-GFP. La comparación de la localización de GFP con las zonas ricas en DNA (núcleo y kinetoplasto) marcadas con DAPI, permitió demostrar que los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con pTREX-*his8-ape1-gfp* presentan la enzima HIS8-APE1-GFP fundamentalmente en el núcleo (Figura 15, C y D). Sin embargo, al contrario de lo observado en los ensayos de fluorescencia directa, es posible detectar una tenue señal correspondiente a la proteína en el citoplasma del parásito, probablemente debido al mayor nivel de sensibilidad de la técnica. Por su parte, de manera similar a lo observado por fluorescencia directa, la proteína HIS8-APE1DN-GFP se encuentra en núcleo y citoplasma parasitario (Figura 15, G y H).

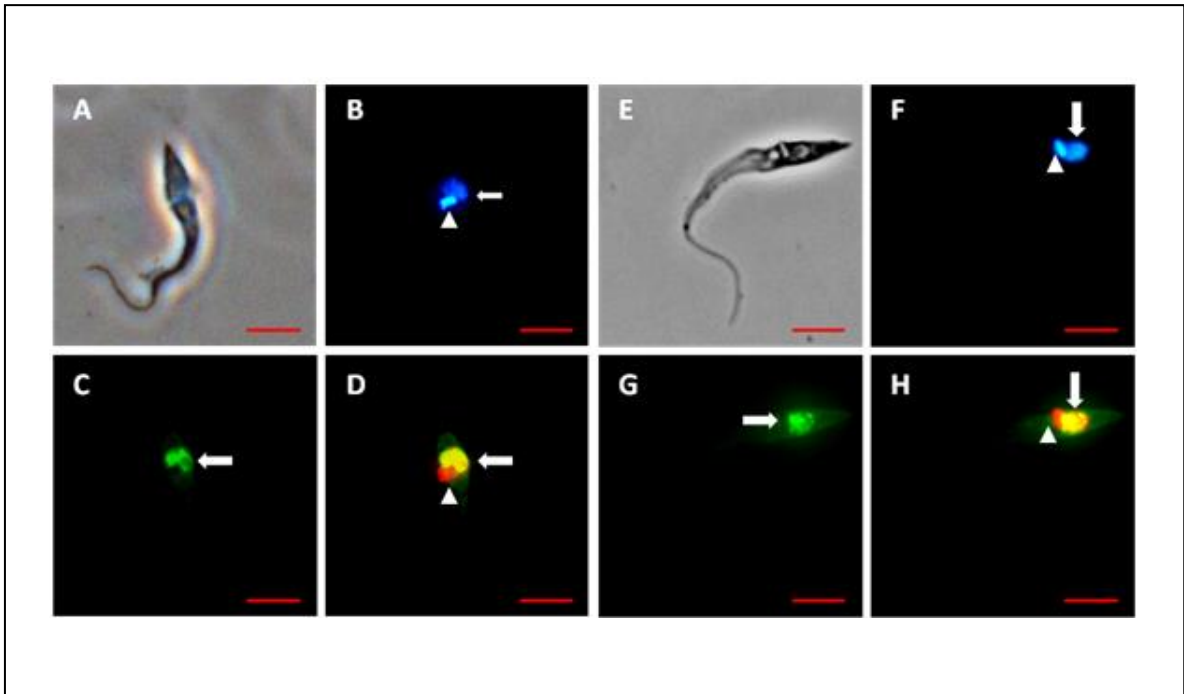


Figura 15: HIS8-APE1-GFP y HIS8-APE1DN-GFP presentan localización nuclear y citosólica en epimastigotes de *T. cruzi*. HIS8-APE1-GFP y HIS-APE1DN-GFP se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-GFP. A y E: Contraste de fase. B y F: DAPI; flecha: núcleo, cabeza de flecha: kinetoplasto. C: Detección de HIS8-APE1-GFP. D: Co-localización de DNA detectado por DAPI y HIS8-APE1-GFP detectado por anti-GFP, utilizando pseudo color rojo de B con fluorescencia verde de C. G: HIS8-APE1DN-GFP detectado con anti-GFP. H: Co-localización de DNA detectado por DAPI y HIS8-APE1DN-GFP detectado por anti-GFP, utilizando pseudo color rojo de F con fluorescencia verde de G. Flecha (→): núcleo; Cabeza de flecha (◄): kinetoplasto. Barra 10µm.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que los parásitos transfectados expresan las proteínas deseadas correctamente y, por lo tanto, pueden ser utilizados para desarrollar los experimentos de evaluación de la expresión de APE1 y APE1DN en la viabilidad de epimastigo

3.6 Evaluación de la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con los plasmidios pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp*, expuestos a estrés oxidativo agudo.

Previamente, y con el objetivo de obtener cultivos altamente enriquecidos con epimastigotes transfectados con los constructos pTREX-*his8-ape1-gfp* y pTREX-*his8-ape1DN-gfp*, debido que al realizar la transfección la efectividad de esta fue cercana al 30 % para APE1 y 70% para APE1DN. parásitos fluorescentes de cada cultivo fueron seleccionados por citometría de flujo. Se obtuvo entre el 90% y el 100% de parásitos positivos a la expresión de GFP, es decir, de aquellos que expresaban los constructos transfectados (Figura 16).

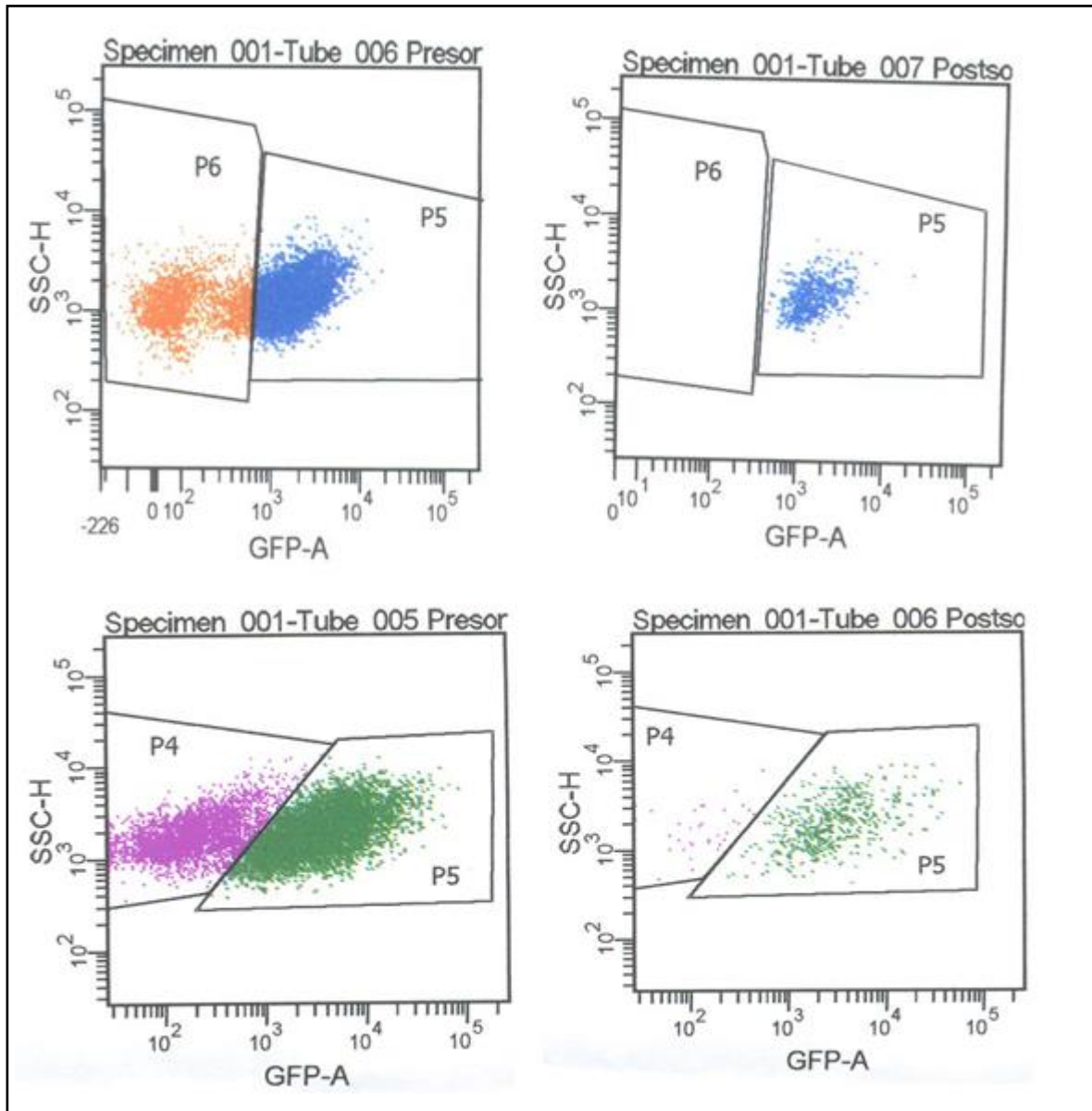


Figura 16: Selección de parásitos transfectados con *pTREX-his8-ape1-gfp* y *pTREX-his8-ape1DN-gfp* por citometría de flujo **A)** Epimastigotes que expresan HIS8-APE1DN-GFP en un cultivo heterogéneo de parásitos (P5:75% parásitos fluorescentes); **B)** Epimastigotes que expresan HIS8-APE1DN-GFP seleccionados mediante citometría de flujo (P5:100% parásitos fluorescentes); **C)** Epimastigotes que expresan HIS8-APE1-GFP en un cultivo heterogéneo de parásitos (P5:55% parásitos fluorescentes); **D)** Epimastigotes que expresan HIS8-APE1-GFP seleccionados mediante citometría de flujo (P5; 94% parásitos fluorescentes).

Los parásitos seleccionados, en una concentración de 12 millones/ml, fueron divididos en 4 grupos, cada uno en triplicado e incubados durante 30 minutos a 28°C, con las siguientes concentraciones de H₂O₂: 0uM, 200uM, 500uM y 1000uM. Después del desafío con H₂O₂ los parásitos fueron lavados en PBS e incubados en medio completo por 4 horas a 20°C. Finalmente, la viabilidad de los epimastigotes se determinó por ensayos de MTT. Se observó que los parásitos transfectados que expresan HIS8-APE1-GFP sobreviven mejor que aquellos transfectados con el vector vacío, mientras que epimastigotes que expresan el mutante HIS8-APE1DN-GFP muestran menor sobrevivencia frente a H₂O₂ (figuras 17 y 18).

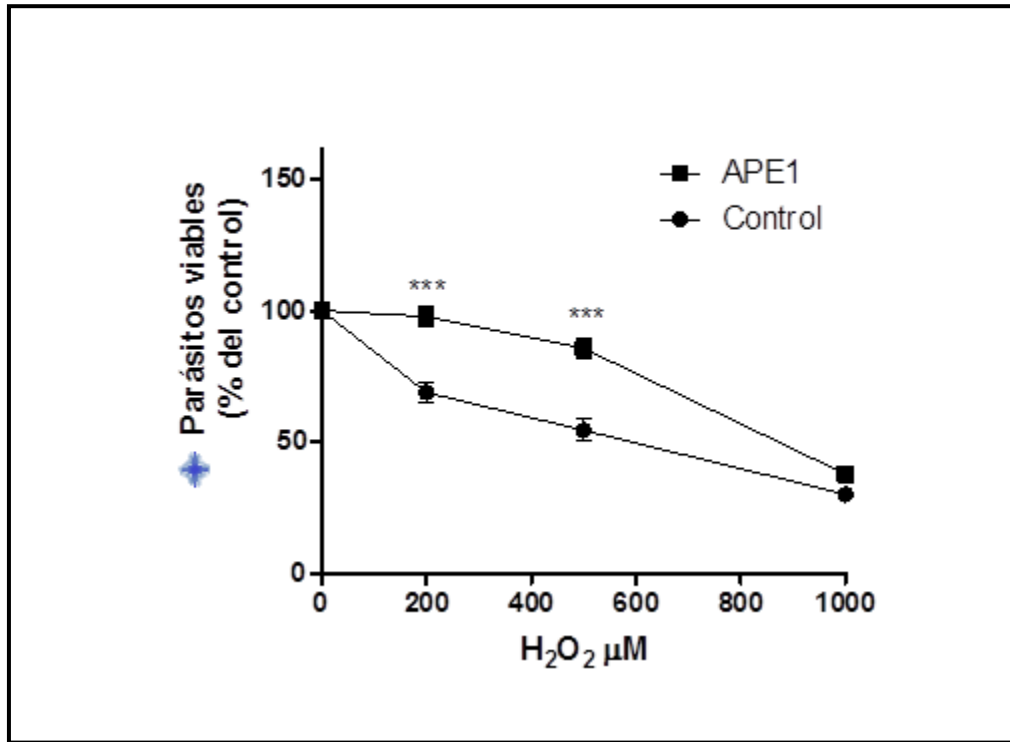


Figura 17: Viabilidad de epimastigotes transfectados con HIS8-APE1-GFP sometidos a estrés oxidativo agudo. Epimastigotes que expresan HIS8-APE1-GFP y epimastigotes transfectados con el vector vacío (controles) fueron tratados durante 30min a 28°C con distintas concentraciones de H₂O₂. Posteriormente, los parásitos fueron lavados e incubados en medio fresco durante 4 horas a 28°C. El análisis de viabilidad se realizó mediante ensayos de MTT. *** P < 0.001

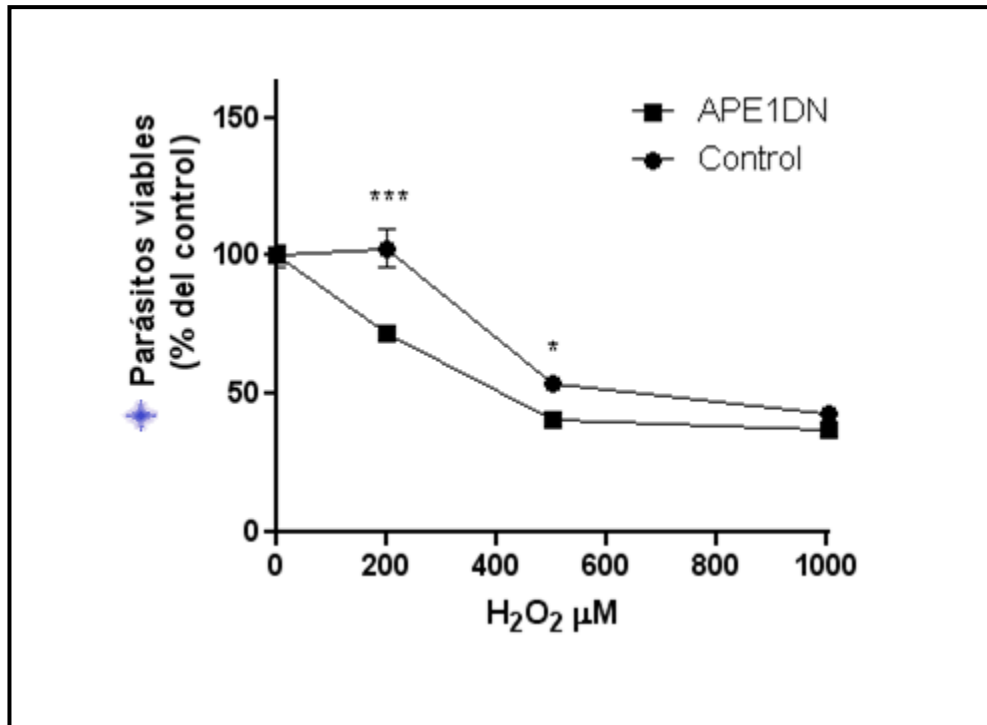


Figura 18: Viabilidad de epimastigotes transfectados con HIS8-APE1DN-GFP sometidos a estrés oxidativo agudo. Epimastigotes que expresan HIS8-APE1DN-GFP y epimastigotes transfectados con el vector vacío (controles) fueron tratados durante 30min a 28°C con distintas concentraciones de H₂O₂. Posteriormente, los parásitos fueron lavados e incubados en medio fresco durante 4 horas a 28°C. El análisis de viabilidad se realizó mediante ensayos de MTT. *** P < 0.001 y * P < 0.005.

Objetivo extra:

3.7 Obtención de la proteína HIS8-APE1DN-GFP

Epimastigotes fueron sedimentados a temperatura ambiente por centrifugación a 2.000 g por 10 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en 5 ml de amortiguador de lisis para purificación de proteínas (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8,0, Tritón X-100 1%, glicerol 10%), y se incubaron durante 30 minutos con agitación a 4° C. Luego, las muestras se sonicaron durante 1 minuto en hielo. El lisado resultante fue centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante, conteniendo la proteína de interés, fue transferido a una columna de agarosa-níquel la que posteriormente fue lavada con 20 ml de buffer de lavado (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 8,0, Tritón X-100 1%, glicerol 10%). La elusión de la proteína recombinante APE-1-DN se realizó utilizando 10ml de buffer de elusión (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, imidazol 300 mM, pH 8,0, Tritón X-100 1%, glicerol 10%) tomando alícuotas secuenciales de 500 µl. Finalmente, se detectó la presencia de HIS8-APE1DN-GFP recombinante mediante ensayos de *western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-histidina y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Inc) (figura 19). Esta proteína será empleada para análisis de actividad.

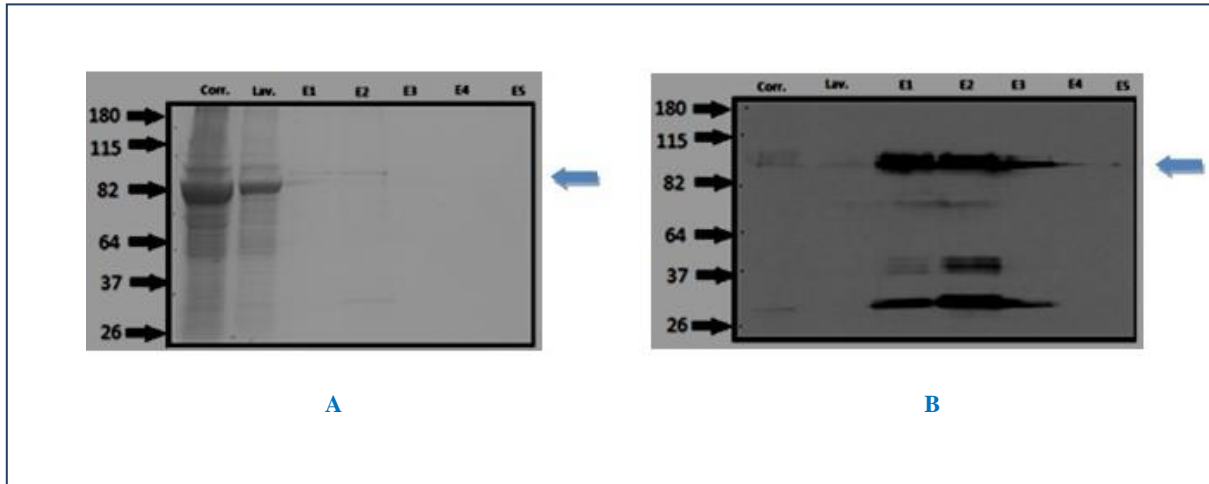


Figura 19: Purificación de la proteína recombinante HIS8-APE1DN-GFP. La purificación de HIS8-APE1DN-GFP se realizó mediante columnas de agarosa-níquel. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de acrilamida y tinción azul de Coomassie (A) y ensayos de *western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-histidina y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a peroxidasa de rábano 1: Proteínas totales; 2: Lavados de la columna previo a elución; E1-E6: Alícuotas secuenciales de elución obtenidas desde la columna de agarosa-níquel. ←

4. DISCUSIÓN.

La vía BER es un proceso evolutivamente conservado que mantiene la integridad genómica y mitocondrial mediante la eliminación de bases oxidadas y alquiladas generadas endógenamente o inducidas por agentes genotóxicos externos (Hegde *et al.*, 2008; Mandavilli *et al.*, 2002).

Ratones knock-out para APE1 presentan letalidad embrionaria (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Meira *et al.*, 2001) y la inhibición de la expresión de APE1 conduce a inviabilidad de células mantenidas *in vitro* (Fung y Demple, 2005; Izumi *et al.*, 2005). Además, la inhibición de la expresión de APE1 mediante RNAi conduce a la apoptosis en las células humanas debido a la acumulación de DNA dañado, especialmente cuando aumentan las ROS (Fung y Demple, 2005; Yang *et al.*, 2007), lo que demuestra la importancia de APE1 para la reparación del DNA.

En *T. cruzi*, las técnicas de generación de knock-out genéticos son complejas y presentan un bajo porcentaje de éxito (Xu *et al.*, 2009); por otra parte, no es posible aplicar técnicas de RNAi en este protozooario (Da Rocha *et al.*, 2004). En esta Memoria de Título se optó por una aproximación experimental basada en la expresión de APE1 humana y la expresión de su dominante negativo (APE1DN) en epimastigotes de *T. cruzi*, buscando potenciar los efectos de TcAP1 endógena así como inhibirla, respectivamente. 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). Curiosamente, las secuencias de aminoácidos deducidas para las endonucleasas del parásito TcAP1 y TcAP2 revelan que ambas presentan los residuos propios del sitio catalítico esperado para las endonucleasas AP canónicas (Barzilay *et al.*, 1995; Sepúlveda *et al.*, 2013). Además, TcAP1 presenta un bolsillo hidrófobo, necesario para el reconocimiento de los sitios AP en el DNA dañado. Si bien el sitio catalítico es conservado entre las endonucleasas AP humana y parasitaria habría importantes diferencias entre la secuencia aminoacídica de ambas proteínas, lo que determinaría diferencias en cuanto a su plegamiento (Sepúlveda *et al.*, 2013).

En esta Memoria de Título se expresó la forma nativa de APE1 humana, así como del dominante negativo APE1DN en epimastigotes de *T. cruzi*, evidenciándose una localización principalmente nuclear para APE1 (aunque por inmunofluorescencia se detectó un pequeño porcentaje de localización citoplasmática) y nuclear y citoplasmática para APE1DN. Sin embargo, no se puede descartar que bajo determinadas circunstancias pueda haber translocación hacia la mitocondria. Al respecto, en algunas células de mamífero APE1 se localiza fundamentalmente en el citoplasma y es translocado al núcleo como consecuencia de daño genotóxico. Para este movimiento es esencial la presencia de los primeros 20 aminoácidos del dominio amino terminal (Sepúlveda *et al.*, 2013). Sin embargo, en otros tipos celulares APE1 se presenta exclusivamente en el núcleo (Kakolyris *et al.*, 1998). A su vez se sabe que la eliminación experimental de los primeros 33 residuos de amino ácidos de APE1 humano de la región amino terminal favorecen su translocación a la mitocondria (Chattopadhyay *et al.*, 2006). Por su parte, experimentos realizados por Sepúlveda *et al.* (2013) indican que epimastigotes que sobreexpresan la endonucleasa AP parasitaria TcAP1 asociada a un tag de GFP se localiza sólo en el núcleo de *T. cruzi*; esta situación no cambia frente a la exposición con ROS/RNS. Sin embargo, según los autores no se puede descartar que TcAP1 endógeno pueda tener otra ubicación subcelular o que sufra translocación luego de la exposición a agentes oxidantes.

La expresión exógena de APE1 humana en *T. cruzi* otorgó mayor resistencia a parásitos expuestos a concentraciones crecientes de H₂O₂. Si bien las diferencias generadas no son significativas en todos los puntos, demuestran claramente una marcada tendencia hacia un incremento en la sobrevivencia de los parásitos transfectados con APE1 silvestre en comparación con los controles. Como se mencionó, estudios recientes han establecido que la sobreexpresión de TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi* incrementa su viabilidad frente al tratamiento con H₂O₂ y NOO- (Sepúlveda *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en esta Memoria de Título al expresar APE1 en epimastigotes señalan que el incremento en la viabilidad de epimastigotes sometidos a estrés oxidativo es en porcentajes similares a lo observado por Sepúlveda *et al.* (2013) para la sobreexpresión de TcAP1, sugiriendo un importante grado de conservación en la actividad endonucleasa AP entre *Homo sapiens* y *T. cruzi*. Este modesto incremento en la sobrevivencia parasitaria podría deberse a que sólo se está

expresando una proteína de la vía BER y no el sistema enzimático completo. Por otra parte también es factible que el nivel de expresión de la enzima TcAP1 endógena sea suficiente para lidiar con el daño oxidativo al DNA y por ende la sobreexpresión de TcAP1 o la expresión exógena de APE1 humana no presente los efectos sobresalientes esperados, pues el sistema de reparación ya estaría saturado.

Por el contrario, la expresión de APE1DN incrementó la sensibilidad de los epimastigotes a dicho agente oxidante probablemente mediante la inhibición de la actividad endonucleasa AP parasitaria, tal como ha sido indicado por McNeill y Wilson (2007). Esta disminución, al igual que lo observado al sobreexpresar la endonucleasa TcAP1 (Sepúlveda *et al.*, 2013) o expresar APE1 humana en epimastigotes, no representa una variación de más de 20 a 30% de la inhibición de viabilidad frente a ROS. Esto puede deberse, por una parte, a que los niveles de expresión de APE1DN no son suficientes en el parásito para impedir la actividad de las endonucleasas AP endógenas de *T. cruzi*. Estos resultados son muy similares a los observados por McNeill y Wilson (2007) para células NCI-H 1299 en respuesta a agentes genotóxicos como metil metano sulfonato, carmustina y dideoxicitidina. Por otra parte, al igual que muchos otros organismos eucariontes, es probable que *T. cruzi* posea otros mecanismos de reparación del daño oxidativo que actúen en concomitancia con la vía BER para reparar el daño oxidativo al DNA. Como se ha reportado, vías como NER y recombinación homóloga, entre otras, participan en la reparación de daño oxidativo al DNA (Berquist and Wilson, 2012; Slupphaug *et al.*, 2003). Aunque hasta el momento estas vías no se han caracterizado en *T. cruzi*, es muy probable que se encuentren presentes y activas en el parásito. El estudio de otras vías de reparación del daño oxidativo al DNA podría complementar la comprensión de los mecanismos empleados por *T. cruzi* para enfrentar y sobrevivir al estrés oxidativo en sus diferentes hospederos.

Otros estudios son necesarios para aclarar la información sobre las vías de reparación del DNA en tripanosomatidos, específicamente las diferencias en la maquinaria de los tripanosomatidos con la maquinaria típica de eucariontes recientes para la reparación del DNA, lo que podría proporcionar posibles blancos terapéuticos contra los parásitos (Gomes *et al.*, 2010).

La enfermedad de Chagas sigue siendo una grave amenaza para la salud humana en gran parte de América Latina, y se ha convertido en la más importante enfermedad parasitaria emergente en los países desarrollados (Fortes *et al.*, 2010). Por lo que es vital encontrar tratamientos más eficaces, con menos efectos secundarios, de forma de evitar los problemas asociados a la etapa crónica de la enfermedad y los efectos económicos que conlleva, sobre todo en los países más pobres.

5. CONCLUSIÓN:

Con estos antecedentes, y luego de determinar que la vía BER y las endonucleasas AP en particular son importantes para la viabilidad del parásito, este estudio posiciona a estas enzimas como un blanco terapéutico promisorio para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ya que, estudios realizados con endonucleasas AP de diferentes organismos han demostrado que es posible lograr la inhibición farmacológica diferencial de su actividad (Simeonov *et al.*, 2009; Zawahir *et al.*, 2009). Esta inhibición diferencial se centra principalmente en la identidad de secuencia y en la forma de la molécula que existe entre la enzima de un organismo y otro. El análisis computacional de las secuencias aminoacídicas de las endonucleasas AP del parásito comparada con su contraparte humana, permitió determinar que la identidad entre TcAP1 y APE1 es cercana al 30% (Sepúlveda *et al.*, 2013). Si bien TcAP1 y APE1 presentan la misma función, tienen un bajo grado de identidad aminoacídica, lo que incrementaría las posibilidades de obtener inhibidores específicos para TcAP1, tal como ha sido establecido entre endonucleasas AP de bacterias y humanos (Simeonov *et al.*, 2009; Zawahir *et al.*, 2009). Estos inhibidores podrían mejorar el efecto antiparasitario generado por las células hospederas humanas y/o mejorar la acción de los medicamentos antichagásicos convencionales.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- **ACQUATELLA, H.** 2007. Echocardiography in Chagas heart disease. Heart Disease in Latin America. Circulation 115(9):1124-31.
- **ANDRADE, S.** 1982. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76(1):123–128.
- **ANDRADE, L.; ANDREWS, N.** 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol. 3(10):819-823.
- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.; 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.
- **ATÍAS, A.** 1994. A case of congenital chagasic megaesophagus: evolution until death caused by esophageal neoplasm, at 27 years of age. Rev med Chil. 122(3):319-22.
- **ATWOOD, J. 3RD; WEATHERLY, D.; MINNING, T.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F.; ORLANDO, R.; TARLETON, R.** 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science 309(5733):473–476.
- **AUFDERHEIDE, AC.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS LE, JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M.** 2004. A 9,000-year record of Chagas 'disease. Proc Natl Acad Sci USA 101(7):2034-2039.
- **AVILA, A.; LIENDO, A.; MARTINEZ, I.; MARTINEZ, A.; POCHEVILLE, G.; EGURBIDE, M.** 2013. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection and vertical

transmission in Latin-American pregnant women in a health area of Biscay. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 31(4):210–216.

- **BALLA, J.; VERCELLOTTI, G.; JENEY, V.; YACHIE, A.; VARGA, Z.; EATON, J. W.; BALLA, G.** 2005. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res*. 49(11):1030-1043
- **BARZILAY, G.; WALKER, L.; ROBSON, C.; HICKSON, I.** 1995. Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: identification of residues important for AP endonuclease and RNase H activity. *Nucleic Acids Res* 23(9):1544–1550.
- **BEERNINK, P.; SEGELKE, B.; HADI, M.; ERZBERGER, J.; WILSON, D. M III.; RUPP, B.** 2001. Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/aprimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism. *J Mol Biol*; 307(4):1023 – 34.
- **BELTRAO, B.; CERRONI, MDE. P.; FREITAS, D.; PINTO, A.; VALENTE, VDA. C.; VALENTE, S.; COSTA, EDE. G.; SOBEL, J.** 2009. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop. Doct.* 39(4):231–232.
- **BERQUIST, B.; WILSON, DM. 3RD.** 2012. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett.* 327(1-2):61-72.
- **BERN, C.; MONTGOMORY, S.; HERWALDT, B.; RASSI, A. JR.; MARINETO, J.; DANTAS, R.; MAGUIRE, J.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. GILMAN, R.; REYES, P.; SALVATELLA, R.; MOORE, A.** 2007. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 298(18):2171-81.

- **BERN, C.; MONTGOMERY, S.** 2009. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 49(5):e52-4.
- **BERN, C.** 2011. Antitrypanosomal therapy for Chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 364(26):2527-2534.
- **BITTENCOURT, A.; SADIGURSKY, M; BARBOSA, H.** 1975. Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 17 (3): 146–159.
- **BITTENCOURT, A.; RODRIGUES DE FREITAS L.; GALVAO DE ARAUJO, M.; JÁCOMO, K.** 1981. Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of ten cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(1):38–42.
- **BITTENCOURT, A.; VIEIRA, G.; TAVARES, H.; MOTA, E.; MAGUIRE, J.** 1984. Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(1):30-3.
- **BITTENCOURT, A.** 1992. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 34:403–408.
- **BOBOLA, M.; BLANK, A.; BERGER, M.; STEVENS, B.; SILBER, J.** 2001. Apurinic/aprimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. *Clin Cancer Res.* 7(11):3510–3518.
- **BOTTO, MAHAN C.** 2012. Nuestras investigaciones: "Ciclo silvestre de la enfermedad de chagas". [en línea]. <<http://www.uchile.cl/noticias/79613/nuestras-investigaciones-ciclo-silvestre-de-la-enfermedad-de-chagas>>. Universidad de Chile, Departamento de Ciencias Ecológicas de la Facultad de Ciencias. [consulta: 10 de julio de 2013].

- **BRENER, Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol. 27:347–382.
- **BRIONES, M.; SOUTO, R.; STOLF, B.; ZINGALES, B.** 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. Mol Biochem Parasitol. 104:219-232.
- **BRUCHER, B.; STEIN, H.; BARTELS, H.; FEUSSNER, H.; SIEWERT, J.** 2001. Achalasia and esophageal cancer: incidence, prevalence, and prognosis. World J. Surg. 25:745–749.
- **BURKOVICS, P.; SZUKACSOV, V.; UNK, I.; HARACSKA, L.** 2006 Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. Nucleic Acids Res. 34(9):2508-15.
- **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.
- **CAMPBELL, D.; WESTENBERGER, S.; STURM, N.** 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. Curr Mol Med 4(6):549–562.
- **CANALS, M.; CATTAN, P.; EHRENFELD, M.** 1999. Assessing the impact of disease vectors on animal populations. Acta Biotheoretica. 46(4):337-45.
- **CHAGAS, C.** 1909. Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159-218

- **CHATTOPADHYAY, R.; WIEDERHOLD, L.; SZCZESNY, B.; BOLDOGH, I.; HAZRA, T.; IZUMI, T.; MITRA, S.** 2006. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 34(7):2067-2076.

- **COURA, J.; JUNQUEIRA, A.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.; MILES, M.** 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18(4):171-6.

- **COURA, J.** 2007. Chagas disease: What is known and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(1):113-122.

- **CRUZ-PACHECO, G.; ESTEVAL, L.; VARGAS, C.** 2012. Control measures for Chagas disease. *Mathematical Biosciences.* 237(1-2):49–60

- **DAROCHA, W.; OTSU, K.; TEIXEIRA, SM.; DONELSON, J.** 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.

- **DA SILVEIRA, A.; LEMOS, E.; ADAD, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J.; D’AVILA REIS, D.** 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Human Pathol* 38(8):1256–1264.

- **DA SILVEIRA, A.; FREITAS, M.; DE OLIVEIRA, E.** 2008. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology* 135(11):1337–1342.

- **DEMPLE, B.; SUNG, J.** 2005. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst).* 4(12):1442 – 9.

- **DE NOYA, B.** 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 201:1308–1315.

- **DE OLIVEIRA, R.; TRONCON, L.; DANTAS, O.; MENGHELLI, U.** 1998. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93(6):884–889.

- **DE REZENDE, J.; MOREIRA, H.** 1988. Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. *Arq.Gastroenterol.* 25(Spec No.):32–43.

- **DE SOUZA, A.; MELO, G.; NÉVEC, J.; VANDERPASD, J.; PIRMEZB, C.; DE CASTROA, S.; ARAÚJO-JORGEA, T.** 2002. *Trypanosoma cruzi*: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. *Exp. Parasitol.* 101(4): 193–199.

- **DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.; SANTOS BARRIAS, E.** 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol.* pii: 295394. doi: 10.1155/2010/295394.

- **DIAS, J.; PRATA, A.; CORREIA, D.** 2008. Problems and perspectives for Chagas' disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(2):193–196.

- **DÍAZ, M.; SOLARI, A.; GONZÁLEZ, C.** 2011. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *J Proteomics.* 74(9):1673-82.

- **DUSTING, G.; TRIGGLE, C.** 2005. Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. *Vasc Health Risk Manag.* 1(2):93–97.

- **EVANS, B.; SMITH, S.** 1997. Analysis of esterification of retinoids in the retinal pigmented epithelium of the Mitf-vit (vitiligo) mutant mouse. *Mol Vis.* 3:11.

- **FÁREZ-VIDAL, M.; GALLEGO, C.; RUIZ-PÉREZ, L.; 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.

- **FERNANDES, M.; ANDREWS, N.** 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(3):734-47.

- **FERNÁNDEZ-VILLAMI, S.; BALTANÁS, R.; ALONSO, G.; VILCHEZ LARREA S.; TORRES, H.; FLAWIÁ, M.** 2008. TcPARP: A DNA damage-dependent poly (ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 38(3-4):277-287.

- **FERREIRA, A; SEGATTO, M.; MENEZES, Z.; MACEDO, A.; GELAPE, C.; DE OLIVEIRA ANDRADE, L.; NAGAJYOTHI, F.; SCHERER, P.; TEIXEIRA, M.; TANOWITZ, H.** 2011. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* 13(12-13):1002–1005.

- **FORTES, A.; DE ABREU VIEIRA, P.; ARANTES, J.; SILVA, M.; PEDROSA, M.; ELÓI-SANTOS, S.; MARTINS-FILHO, O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M.; TAFURI, W.; CARNEIRO C.** 2010. Increase of reactive oxygen species by desferrioxamine during experimental Chagas' disease. *Redox Rep.* 15(4):185-90.

- **FORTINI, P.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; D'ERRICO, M.; SIMONELLI, V.; DOGLIOTTI, E.** 2003. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*. 85(11):1053 – 71.
- **FREITAS, J.; AMATO NETO, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; NUSSENZVEIG, V.; BARRETO, J.** 1952 Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev. Paul. Med.* 40(1):36–40.
- **FROSINA, G.** 2000 Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *Eur J Biochem*. 267(8):2135-2149.
- **FUENTES, B.; MATURANA, A.; CRUZ, M.** 2012 Efficacy of nifurtimox for the treatment of chronic Chagas disease. *Rev Chilena Infectol*. 29(1):82-6.
- **FUNG, H.; DEMPLE, B.** 2005 A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell*. 17(3):463-70.
- **FURTADO, C.; KUNRATH-LIMA, M.; RAJÃO, M.; MENDES, I.; DE MOURA, M.; CAMPOS, P.; MACEDO, A.; FRANCO, G.; PENA, S.; TEIXEIRA, S.; VAN HOUTEN, B.; MACHADO, C.** 2012 Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 7(8):e42484.
- **GALANTI, N.; GALINDO, M.; SABAJ, V.; ESPINOZA, I.; TORO, G.** 1998 Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today*. 14(2):64-70.
- **GASCON, J.; PINAZO, M.** 2008 Control de la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en España: principal reto de la patología importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 26(10):607-8.

- **GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.** 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115(1-2):22-7.
- **GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M.** 2010. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2(50):323-54.
- **GRAÇA-SOUZA, A.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G.; BRAZ, G.; PAES, M.; SORGINE, M.; OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA, P.** 2006 Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol.* 36(4): 322-35.
- **GUPTA, S.; WEN, J.; GARG, N.** 2009 Review Article Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009:190354. Epub 2009 Jun 14.
- **GÜRTLER, RE.; CEBALLOS RE.; ORDOÑEZ-KRANSNOWSKI P.; LANATI LA.; STARIOLO, R.; KITRON, U.** 2009 Strong host-feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: implications for the epidemiology of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 26; 3(5):e447.
- **HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.** 1984 Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219(1):1-14.
- **HEGDE, M.; HAZRA, T.; MITRA, S.** 2008 Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18(1): 27-47.
- **HERWALDT, B.; GRIJALVA, M.; NEWSOME, A,** 2000 Use of the polymerase chain reaction to diagnose the fifth reported US case of autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, in Tennessee, 1998. *J Infect Dis.* 181(1):395-399.

- **HERWALDT, B.** 2001 Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin. Microbiol.Rev.*14(4):659–688.
- **HIGUCHI, M.; BENVENUTI, L.; MARTINS, M.; METZGER, M.** 2003 Pathophysiology of the heart in Chagas' disease. Current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 60(1):96-107.
- **HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V.; WILSON, M.; MONCADA, S.** 1992 Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J.* 281(Pt 2):419-424.
- **IDE, H.; KOTERA; M.** 2004 Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull.* 27(4): 480-485.
- **ILLIZZI, J.; HARRIS, N.; MANVILLA, B.; KIM, D.; LI, M.; DROHAT, A.; WILSON, D.** 2013 Functional assessment of population and tumor-associated APE1 protein variants. *PLoS One.* 8(6):e65922.
- **IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.; WILKINSON, S.; FLOHE, L.; RAD, R.** 2008 Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification *Free Radical Biology & Medicine.* 45 (6):733–742.
- **IZUMI, T.; BROWN, D.; NAIDU. C.; BHAKAT, K.; MACINNES, M.; SAITO, H.; CHEN, D.; MITRA, S.** 2005 Two essential but distinct functionsb of the mammalian abasic endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(16):5739 – 43.
- **JACKSON, E.; THERIOT, C.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; IZUMI, T.** 2005 Analysis of nuclear transport signals in the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1/Ref1). *Nucleic Acids Res.* 3(10):3303–3312.

- **JERCIC, M.; MERCADO, R.; VILLARROEL, R.** 2010 Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *J Clin Microbiol.* 48(10):3824-3826
- **KAKOLYRIS, S.; KAKLAMANIS, L.; GIATROMANOLAKI, A.; KOUKOURAKIS, M.; HICKSON, I.; BARZILAY, G.; TURLEY, H.; LEEK, R.; KANAVAROS, P.; GEORGOULIAS, V.; GATTER, K.; HARRIS, A.** 1998 Expression and subcellular localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/ Ref-1) protein: a basis for its role in human disease. *Histopathology.* 33(6):561–569.
- **KUMAR, P.; BHARTI, S.; VARSHNEY, U.** 2011 Uracil excision repair in *Mycobacterium tuberculosis* cell-free extracts. *Tuberculosis (Edinb).* 91(3):212-8.
- **KUN, H.; MOORE, A.; MASCOLA, L.; STEURER, F.; LAWRENCE, G.; KUBAK, B.; RADHAKRISHNA, S.; LEIBY, D.; HERRON, R.; MONE, T.; HUNTER, R.; KUEHNERT, M.** 2009 Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 48(11):1534–1540.
- **LIU Y., ZHOU J., OMELCHENKO M., BELIAEV A., VENKATESWARAN A., STAIR J., WU L., THOMPSON D., XU D., ROGOZIN I., GAIDAMAKOVA E., ZHAI M., MAKAROVA K., KOONIN E., AND DALY M.** 2003 Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 100 (7):4191-6.
- **LUO, M; KELLEY M.** 2004 Inhibition of the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone. *Anticancer Res.* 24 (4):2127– 34.
- **MACEDO, A.; PEÑA S.** 1998 Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today.* 14(3):119–124.

- **MAGUIRE J.**2004. Trypanosoma, In Gorbach S., Bartlett J., Blacklow N. (ed.), Infectious diseases, 2nd ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. p. 2327–2334.
- **MANDAVILLI, B.; SANTOS, J.; VAN HOUTEN, B.** 2002 Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res.* 509(11-2):127-151.
- **MARENSTEIN, D.; WILSON, D. 3RD; TEEBOR, G.** 2004 Human AP endonuclease (APE1) demonstrates endonucleolytic activity against AP sites in single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst).* 3(5):527-33.
- **MARKKANEN, E.; DORN, J.; HUBSCHER, U.** 2013 MUTYH DNA glycosylase: the rationale for removing undamaged bases from the DNA. *Front. Genet.* 4:18.
- **MARIN-NETO, J. CUNHA-NETO E.; MACIEL, B.; SIMOES, M.** 2007 Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 115(9):1109–1123.
- **MASSON, M.; NIEDERGANG, C.; SCHREIBER, V.; MULLER, S.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G.** 1998 XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 18(6): 3563-3571.
- **MCNEILL, DR.; WILSON, D., 3RD.** 2007 A dominant-negative form of the major human abasic endonuclease enhances cellular sensitivity to laboratory and clinical DNA-damaging agents. *Mol Cancer Res.* 5(1):61-70.
- **MEHLOTRA, R.** 1996 Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit Rev Microbiol.* 22(4):295-314.

- **MILES, M.; FELICIANGELI, M.; DE ARIAS A.** 2003 American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326(7404):1444–1448.

- **MINISTERIO DE SALUD BRASIL.** 2005 Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(3):7–29 [en portugués].

- **MINSAL-MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2011 Circular de vigilancia de Enfermedad de Chagas (CIE 10: B57, P00.2 y Z22.8).

- **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>. [consulta: 20-12-12].

- **MINSAL-MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2015 Boletín Epidemiológico Trimestral, Enfermedad de Chagas Volumen 111, nº 1(C I E10:B57.0-B57.5 ; Z22.8 ; Y P 00.2).

- **MITRA, S.; IZUMI, T.; BOLDOGH, I.; BHAKAT, K.; HILL, J.; HAZRA, T.** 2002 Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. *Free Radic. Biol. Med.* 33(1):15–28.

- **MONCAYO, A.** 2003 Chagas disease: current epidemiological trends alter the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98. (5): 577-91

- **MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.** 2006 An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100(8):663–677.

- **MOTA, E.; TODD, C.; MAGUIRE, J.; PORTUGAL, D.; SANTANA, O.; RIBEIRO FILHO, R.; SHERLOCK, I.** 1984 Megaesophagus and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(5):820–826.

- **NOBREGA, A.; GARCIA, M.; TATTO, E.; OBARA, M.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W.** 2009 Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15(4):653–655.

- **PAES, M.; CONSENTINO-GOMES, D.; FERNANDES DE SOUZA, C.; PEREIRA DE ALMEIDA NOGUERIA, N.; MEYER-FERNANDES, J.** 2011 The role of heme and reactive oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res.* (174614):1-8.

- **PAHO-PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION,** 2006. National Blood Systems in the Caribbean and Latin American countries: Basic indicators of their status in 2004. THS/EV-2006/002.

- **PAIVA, C.; FEIJO, D.; DUTRA, F.; CARNEIRO, V.; FREITAS, G.; ALVES, L.; MESQUITA, J.; FORTES, G.; FIGUEIREDO, R.; SOUZA, H.; FANTAPPIE, M.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M.** 2012 Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest.* 122(7):2531–2542.

- **PENA-DIAZ, J.; AKBARI, M.; SUNDHEIM, O.; FAREZ-VIDAL, M.; ANDERSEN, S.; SNEVE, R.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; KROKAN, H.; SLUPPHAUG, G.** 2004 *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair. *J Mol Biol.* 342(3): 787-99.

- **PÉREZ, J.; GALLEGO, C.; BERNIER-VILLAMOR, V.; CAMACHO, A.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; RUIZ-PÉREZ, L.** 1999

Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the Trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 27(3):771-777.

- **PIACENZA, L.; ALVAREZ, M.; PELUFFO, G.; RADI, R.** 2009 Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. Curr.Opin.Microbiol. 12(4):415-421.
- **PINES, A.; ERRONE, L.; BIVINI, A.; ROMANELLO, M.; DAMANTE, G.; GULISANO, M.; KELLEY, M.; QUADRIFOGLIO, F.; TELL, G.** 2005 Activation of APE1/Ref-1 is dependent on reactive oxygen species generated after purinergic receptor stimulation by ATP. Nucleic Acids Res. 33(14):4379-94.
- **PRATA, A.** 2001 Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 1(2):92-100
- **PUGLISI, F.; APRILE, G.; MINISINI, A.; BARBONE, F.; CATALDI, I.; KELLEY, M., DAMANTE, G.; BELTRAMI, C.; DI LORETO, C.** 2001 Prognostic significance of Ape1/ref-1 subcellular localization in non-small cell lung carcinomas. Anticancer Res 21(6A):4041-9.
- **RAMANA, C.; BOLDOGH, I.; IZUMI, T.; MITRA, S.** 1998 Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. Proc Natl Acad Sci U SA. 95(9):5061-6.
- **RASSI, A. JR.; RASSI, S.; RASSI A.** 2001 Sudden death in Chagas' disease. Arq Bras Cardiol. 76(1):75-96.
- **RASSI, A.; LUQUETTI, A.; RASSI, A. JR.; RASSI, G.; RASSI, S.; DA SILVA, I.; I.; RASSI, G.** 2007 Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of

allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 76(1):58–61.

- **RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, JA.** 2009 Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(1):152–8.
- **RASSI, A.; RASSI, A. JR.; MARIN-NETO, J.** 2010 Chagas disease. *Lancet.* 375(9723): 1388-1402.
- **RASSI, A.; REZENDE, J.; RASSI, J.** 2012 American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.*26(2):275-91.
- **RIARTE A., LUNA C., SABATIELLO R., SINAGRA A., SCHIAVELLI R., DE RISSIO A., MAIOLO E., GARCIA MM. JACOB N., PATTIN M., LAURICELLA M., SEGURO EL. VAZQUEZ M.** 1999 Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989–1996. *Clin. Infect. Dis.* 29 (3):561–567.
- **SCHIELKE, J.; SELVARANGAN, R.; KYES, K.; FRITSCHKE, T.** 2002 Laboratory diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a colony-raised pigtailed macaque. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 41(4):42-5.
- **SCHMUNIS, GA.; CRUZ, R.** 2005 Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Ver.* 18 (1):12-29.
- **SCHMUNIS, G.; YADON, Z.** 2010 Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115(1–2):14–21.

- **SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAUDE DE BRASIL.** 2 007 Posting date. Doença de Chagas Aguda. Nota Técnica, 9 de Outubro de 2007. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf>. [consulta: 30-07-2013]
- **SEPÚLVEDA, S.; VALENZUELA, L.; IPONCE, I.; SIERRA, S.; BAHAMONDES, P.; RAMIREZ, S.; ROJAS, V.; KEMMERLING, U.; GALANTI, N.; CABRERA, G.** 2013 Expression, Functionality and localization apurinic/aprimidic endonucleases in replicativa and non-replicative forms of *T. cruzi*. *J Cell Biochem* 15(2):397-409.
- **SHACKELFORD R, KAUFMANN W, PAULES R.** 2000 Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 1;28(9):1387-404.
- **SILBER, J.; BOBOLA, M.; BLANK, A.; SHOELER, K.; HAROLDSON, P.; HUYNH, MB.; KOLSTOE, D.** 2002 The apurinic/aprimidic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clin Cancer Res.* 8(9):3008-18.
- **SIMEONOV, A.; KULKARNI, A.; DORJSUREN, D.; JADHAV, A.; SHEN, M.; MCNEILL, D.; AUSTIN, C.; WILSON, D.** 2009 Identification and characterization of inhibitors of human apurinic/aprimidic endonuclease APE1. *Plos one.* 4(6):e5740.
- **SOUZA, R.; LIMA, F.; BARROS, R.; CORTEZ, D.; SANTOS, M.; CORDERO, E.; RUIZ, J.; GOLDENBERG, S.; TEIXEIRA, M.; DA SILVEIRA JF.** 2011 Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE.* 6(8):e23042.
- **TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N.** 2006 Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(5):463-491.

- **TELL, G.; DAMANTE, G.; CALDWELL, D.; KELLEY, M.** 2005 The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? *Antioxid Redox Signal. Proc Natl Acad Sci U S A* 7(3-4):367–384.

- **TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; SUÁREZ, E.; RODRÍGUEZ, P.; TORRICO, M.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y.** 2004 Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 70 (2):201-209.

- **TOSO, M.; VIAL, F.; GALANTI, N.** 2011 “Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral”. *Rev Med Chil.* 139 (2):258-266.

- **TURRENS, J.** 2004 Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med* 25(1-2):211-20.

- **TYLER, K.; ENGMAN, D.** 2001 The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31(3-5):472-81.

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

- **WANG, D.; LUO, M.; KELLEY, M.** 2004 Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol. Cancer Ther.* 3(6):679–686.

- **WANG, Y.; SHUPENKO, C.; MELO, L.; STRAUSS, P.** 2006 DNA repair protein involved in heart and blood development. *Mol. Cell. Biol.* 26(23):9083–9093.

- **WEGNER, D.; ROHWEDDER, R.** 1972 The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung*. 22(9):1624–1635

- **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>. [consulta: 10-09-13].

- **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>. [consulta: 10-09-13].

- **WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2013 La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) centro de prensa. [en línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>>. [consulta: 20-08-2013].

- **WORLD BANK. WORLD DEVELOPMENT REPORT.** 1993 Investing in Health. The World Bank, Oxford University Press, p. 216-224.

- **XANTHOUDAKIS, S.; SMEYNE, R.; WALLACE, J.; CURRAN, T.** 1996 The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(17):8919-23.

- **XU, D.; BRANDÁN, C.; BASOMBRÍO, M.; TARLETON, R.** 2009 Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol*.9:90.

- **YANG, S.; IRANI, K.; HEFFRON, S.; JURNAK, F.; MEYSKENS, F.; JR.** 2005 Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor. *Mol Cancer Ther* 4(12):1923–1935

- **YANG, S.; MISNER, B.; CHIU, R.; MEYSKENS, F.** 2007 Redox effector factor-1, combined with reactive oxygen species, plays an important role in the transformation of JB6 cells. *Carcinogenesis* 28(11):2382–2390.

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

- **ZACKS, M.; WEN, 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.

- **ZAWAHIR, Z.; DAYAM, R.; DENG, J.; PEREIRA, C.; NEAMATI, N.** 2009 Pharmacophore guided discovery of small-molecule human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 inhibitors. *J Med Chem* 52(1):20-32.

- **ZHANG, Q.; PAN, J.; ZHAO, CH.; WANG, Y.; JIA, Z.; ZHENG, R.** 2008 Non-enzymatic fast repair of DNA oxidative damage might also exist in cells. *Cell Biol Int.*; 32(6): 654-662.

- **ZINGALES, B.; STOLF, B.; SOUTO, R.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.** 1999 Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 94(1):159-164.

- **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.