

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA FLAP
ENDONUCLEASA DE TRYPANOSOMA CRUZI (TcFEN1). SU
ROL EN LA PROLIFERACIÓN DEL PARÁSITO Y SU
RESISTENCIA FRENTE A DAÑO OXIDATIVO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
académico de Doctor en Bioquímica por:**

IVÁN ALEXIS PONCE LÓPEZ

Director de Tesis: Dr. Norbel Galanti Garrone

Santiago-CHILE

Julio 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

IVÁN ALEXIS PONCE LÓPEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público rendido el día _____ de _____ de 2017.

Director de Tesis:

Dr. Norbel Galanti Garrone

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. M. Antonieta Valenzuela P. (Presidenta)

Dr. Juan Diego Maya A.

Dr. Mario Chiong Lay

Dr. Carlos Santiviago Cid

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, Prof. Norbel Galanti, por su consejo, paciencia y apoyo, además de la confianza necesaria para desarrollar esta tesis. A mis amigos y compañeros de laboratorio, gracias a quienes pasé años llenos de gratos momentos, y que siempre estuvieron atentos a darme una mano, alguna sugerencia, una palabra de ánimo: Gonzalo, Sofía, Natalia, Lucía, José, Santiago, Gilda, Paula, Soledad, Camila, Bernardita, Carmen y Fernando.

Agradezco a los miembros de la comisión evaluadora, Dra. María Antonieta Valenzuela, Dr. Juan Diego Maya, Dr. Mario Chiong y Dr. Carlos Santiviago, que con su mirada crítica, comentarios y disposición me ayudaron a encauzar y dar forma a mi trabajo de tesis. Al Dr. Martín Montecino y Dr. Giancarlo de Ferrari, que formaron parte de la comisión en una primera instancia.

Agradezco a mi familia, que me ayudó a superar los diversos obstáculos que enfrenté en estos años de tesis, brindándome su cariño y apoyo en todo momento. A mis padres, Mario y Erasma, que siempre me han motivado a superarme y no dejarme abatir por las dificultades; a mi hermana, Tania, cuyo ímpetu y valentía me llenan de orgullo constantemente; a mi pareja, Nicole, que con su jovialidad y espontaneidad renuevan mis fuerzas día a día, y a mis hijos Alonso y Tania, mis más grandes fuentes de inspiración y alegría, siendo ellos tanto mi mayor logro, como mi mayor desafío.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones

Ponce, I., Aldunate, C., Valenzuela, L., Sepúlveda, S., Garrido, G., Kemmerling, U., Cabrera, G y Galanti, N. (2016). "A flap endonuclease (TcFEN1) is involved in *Trypanosoma cruzi* cell proliferation, DNA repair, and parasite survival". *Journal of Cellular Biochemistry*, 9999:1-11.

Ormeño, F., Barrientos, C., Ramirez, S., **Ponce, I.**, Valenzuela, L., Sepúlveda, S., Bitar, M., Kemmerling, U., Machado, C., Cabrera, G. y Galanti, N. (2016). "Expression and the peculiar enzymatic behavior of the *Trypanosoma cruzi* NTH1 DNA glycosylase". *PLoS ONE*, 11(6): e0157270.

Sepulveda, S., Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Sierra, S., Bahamondes, P., Ramirez, S., Rojas, V., Kemmerling, U., Galanti, N. y Cabrera, G. (2014). "Expression, functionality, and localization of apurinic/apyrimidinic endonucleases in replicative and non-replicative forms of *Trypanosoma cruzi*". *Journal of Cellular Biochemistry*, 115: 397-409.

Presentaciones a congresos internacionales

Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Sepulveda, S., Ormeño, F., Barrientos, C., Cabrera, G., Galanti, N. "Glycosylases and endonucleases of BER pathway: Presence and activity in DNA repair in *Trypanosoma cruzi*". 13th International Congress of Parasitology (Ciudad de Méjico, Méjico, 2014).

Ponce, I., Aldunate, C., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Astorga, R., Ormeño, F., Barrientos, C., Perez, C., Cabrera, G., Galanti, N. "TcFEN1 endonuclease is expressed in *Trypanosoma cruzi* and increases its resistance to sustained oxidative stress". X Congreso de Protozoología y Enfermedades Parasitarias (Mar del Plata, Argentina, 2014).

Cabrera, G., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Sierra, S., Bahamondes, P., Kemmerling, U., Galanti, N. "DNA damage and the Base Excision Repair pathway as a survival strategy in *Trypanosoma cruzi*". 11th

International Conference of Environmental Mutagens (Foz do Iguacu, Brasil, 2013).

Sepúlveda, S., Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Bahamondes, P., Sierra, S., Ramírez, S., Garrido, G., Delgadillo, J., Muñoz, N., Kemmerling, U., Galanti, N., Cabrera, G. "Participación de TcAP1 y TcAP2 en la vía de reparación del DNA por escisión de bases en *Trypanosoma cruzi* y su rol en la sobrevivencia a estrés oxidativo". XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (Rosario, Argentina, 2013).

Ponce, I., Garrido, G., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Bahamondes, P., Julio, B., Barrientos, C., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. "Determinación y análisis de la actividad FLAP endonucleasa en *Trypanosoma cruzi*". XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología (Rosario, Argentina, 2013).

Sepúlveda, S., Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Bahamondes, P., Garrido, G., Galanti, N., Cabrera, G. "La reparación del DNA de *Trypanosoma cruzi* mediante escisión de bases (vía BER) como posible blanco terapéutico de la enfermedad de Chagas". XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP 2013 (Guayaquil, Ecuador, 2013).

Sepúlveda S., Valenzuela L., **Ponce I.**, Ramírez S., Bahamondes P., Sierra S., Kemmerling U., Galanti N., Cabrera G. "DNA repair enzymes are related to *T. cruzi* infection persistence". XVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine (Rio de Janeiro, Brasil, 2012).

Cabrera, G., Sepúlveda, S., **Ponce, I.**, Valenzuela, L., Ramirez, S., Bahamondes, P., Sierra, S., Kemmerling, U., Galanti, N. "Oxidative DNA damage and base excision repair (BER) in *Trypanosoma cruzi*". XV Congreso Latinoamericano de Genética (Rosario, Argentina, 2012).

Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Delgadillo, J., Ramirez, S., **Ponce, I.**, Muñoz, N., Kemmerling, U., Galanti, N., Cabrera, G. "*Trypanosoma cruzi*: DNA damage and repair as a possible therapeutic target". IX Congreso de Protozoología y Enfermedades Parasitarias (Mar del Plata, Argentina, 2011).

Sepúlveda, S., **Ponce, I.**, Valenzuela, L., Delgadillo, J., Ramírez, S., Sierra, S., Bahamondes, P., Muñoz, N., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. "Identificación de la expresión y de la actividad de la endonucleasa de reparación del DNA TcAP1 en *Trypanosoma cruzi*". XX Congreso Latinoamericano de Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical (Bogotá, Colombia, 2011).

Presentaciones a congresos nacionales

Ponce, I., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Garrido, G., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “FLAP endonuclease. Presence and activity in cell proliferation and DNA repair in *Trypanosoma cruzi*”. XII Congress Pan-American Association for Biochemistry & Molecular Biology and XXXVII Annual Meeting Society of Biochemistry & Molecular Biology of Chile (Puerto Varas, Chile, 2013). *Presentación oral*.

Ramírez, S., **Ponce, I.**, Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Sierra, S., Bahamondes, P., Muñoz, N., Kemmerling, U., Galanti, N., Cabrera, G. “Sobreexpresión de las DNA glicosilasas de reparación TcOGG1 y TcNTH1 de *Trypanosoma cruzi*”. IV Simposio Internacional Enfermedad de Chagas y XV Jornadas anuales de parasitología (SOCHIPA) (Santiago, Chile, 2013).

Ponce, I., Garrido, G., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Bahamondes, P., Julio, B., Barrientos, C., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “Daño y reparación del DNA: Determinación y análisis de la actividad FLAP endonucleasa en *Trypanosoma cruzi*”. IV Simposio Internacional Enfermedad de Chagas y XV Jornadas Anuales de Parasitología (SOCHIPA) (Santiago, Chile, 2013).

Sepúlveda, S., Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Bahamondes, P., Sierra, S., Ramírez, S., Garrido, G., Delgadillo, J., Muñoz, N., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “Endonucleasas TcAP1 y TcAP2 en la vía de reparación del DNA de *Trypanosoma cruzi* por escisión de bases y su rol en la sobrevivencia del parásito frente a estrés oxidativo”. III Simposio Internacional Enfermedad de Chagas (Santiago, Chile).

Ponce, I., Sepúlveda, S.E., Garrido, G., Valenzuela, L., Ramírez, S., Sierra, S., Bahamondes, P., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “Actividad de endonucleasa Flap en *Trypanosoma cruzi*”. III Simposio Internacional Enfermedad de Chagas (Santiago, Chile, 2012).

Cabrera, G., Sepúlveda, S., **Ponce, I.**, Valenzuela, L., Bahamondes, P., Garrido, G., Sierra, S., Ramírez, S., Kemmerling, U., Galanti, N. “Actividad AP y Flap endonucleasas en *Trypanosoma cruzi*”. LV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile (Puerto Varas, Chile, 2012).

Ramírez, S., **Ponce, I.**, Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Sierra, S., Bahamondes, P., Muñoz, N., Kemmerling, U., Galanti, N., Cabrera, G. “Overexpression of DNA repair glycosylases TcOGG1 And TcNTH1 in *Trypanosoma cruzi*”.

XXVI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas, Chile, 2012).

Bahamondes, P., **Ponce, I.**, Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Ramírez, S., Sierra, S., Muñoz, N., Kemmerling, U., Galanti, N., Cabrera, G. “Expression of the human APE1 endonuclease and its negative dominant form in *T. cruzi* epimastigotes exposed to oxidative agents”. XXVI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas, Chile, 2012).

Ponce, I., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Ramírez, S., Sierra, S., Bahamondes, P., Garrido, G., Muñoz, N., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “Detection of flap endonuclease activity in *Trypanosoma cruzi*”. XXVI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas, Chile, 2012).

Cabrera, G., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Delgadillo, J., Ramírez, S., **Ponce, I.**, Barría, C., Kemmerling, U., Galanti, N. “Mecanismos de reparación del DNA de *Trypanosoma cruzi* frente a estrés oxidativo”. XXV Reunión Científica Sociedad Chilena de Parasitología. 18 de noviembre de 2011 (Santiago, Chile, 2011).

Ponce, I., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Delgadillo, J., Ramírez, S., Sierra, S., Bahamondes, P., Muñoz, N., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “Expression and activity of TcAP1, a repair DNA endonuclease in *Trypanosoma cruzi*”. XXV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas, Chile, 2011).

Sepúlveda, S., Valenzuela, L., **Ponce, I.**, Delgadillo, J., Ramírez, S., Sierra, S., Bahamondes, P., Muñoz, N., Kemmerling, U., Galanti, N., Cabrera, G. “*T. cruzi* DNA repair enzymes TcAP1 and TcAP2 are localized in the nucleus and their overexpression increases epimastigote viability when submitted to oxidative stress”. XXV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas, Chile).

Ponce, I., Sepúlveda, S., Valenzuela, L., Delgadillo, J., Ramírez, S., Sierra, S., Bahamondes, P., Muñoz, N., Kemmerling, U., Cabrera, G., Galanti, N. “Identificación de la expresión y de la actividad de la endonucleasa de reparación del DNA TcAP1 en *Trypanosoma cruzi*”. Congreso Ciencia Joven 2011, XIV Aniversario del ICBM (Santiago, Chile, 2011).

BECAS Y FINANCIAMIENTO

La realización de estos estudios de doctorado fue posible gracias a la Beca CONICYT para Estudios de Doctorado en Chile (Folio 21100768). Para la ejecución de las distintas actividades realizadas durante esta tesis doctoral, se obtuvo financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto Bicentenario Anillo ACT112
- Proyecto FONDECYT 1090124 (Dr. Norbel Galanti G.)
- Proyecto FONDECYT 11100053 (Dr. Gonzalo Cabrera V.)
- Proyecto FONDECYT 1130113 (Dr. Norbel Galanti G.)
- Proyecto FONDECYT 1120230 (Dra. Ulrike Kemmerling)

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	IV
DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	V
Publicaciones.....	V
Presentaciones a congresos internacionales	V
Presentaciones a congresos nacionales	VII
BECAS Y FINANCIAMIENTO.....	IX
TABLA DE CONTENIDOS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	XIV
ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	XVI
RESUMEN.....	.1
SUMMARY.....	.4
1. INTRODUCCIÓN.....	.7
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas7
1.2 <i>T. cruzi</i> y resistencia a estrés oxidativo	12

1.3 Estrés oxidativo, daño al DNA y mecanismos de reparación.....	16
1.4 Reparación en <i>T. cruzi</i> del daño al DNA causado por agentes oxidantes.....	21
1.5 Flap endonucleasas y resistencia al daño oxidativo en el DNA.....	22
2. HIPÓTESIS.....	27
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1 Cultivos celulares.....	30
4.2 Homogeneizados de <i>T. cruzi</i>	31
4.3 Ensayos de actividad flap endonucleasa.....	31
4.4 Construcción de los plásmidos pGEM- <i>tcfen1</i> , pQE-80L- <i>tcfen1</i> , pTREX- <i>his-tcfen1-gfp</i> y pTREX- <i>tcfen1-gfp-his</i>	34
4.5 Transfección y sobreexpresión de HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	37
4.6 Purificación de las proteínas recombinantes HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS.....	39

4.7 Localización de las proteínas HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	39
4.8 Ensayos de proliferación de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados	40
4.9 Exposición de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados a distintas concentraciones de H ₂ O ₂ de forma aguda y sostenida.....	40
4.10 Ensayos de viabilidad de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados frente a condiciones de estrés oxidativo agudo y sostenido.....	41
4.11 Bioinformática y modelamiento molecular	42
4.12 Análisis estadístico	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 <i>T. cruzi</i> presenta actividad flap endonucleasa	44
5.2 Un gen que codifica una flap endonucleasa está presente en el genoma de <i>T. cruzi</i>	47
5.3 Expresión y actividad de las proteínas HIS-TcFEN1, HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS.....	51
5.4 La proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP expresada en <i>T. cruzi</i> se localiza en el núcleo del parásito.....	57

5.5 La sobreexpresión de TcFEN1 aumenta la proliferación del parásito.....	60
5.6 La sobreexpresión de TcFEN1 no altera la sobrevivencia de los parásitos expuestos a estrés oxidativo agudo, pero si bajo estrés oxidativo sostenido	61
6. DISCUSIÓN	66
7. CONCLUSIONES	76
8. REFERENCIAS	78
ANEXO I	87
ANEXO II	88
ANEXO III	89
ANEXO IV	90

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 2. Vía BER en mamíferos	19
Figura 3. Sustrato modelo para la actividad flap endonucleasa y estructura de hFEN1	24
Figura 4. Estructura del sustrato FLAP	33
Figura 5. Actividad flap endonucleasa en homogeneizados de <i>T. cruzi</i>	45
Figura 6. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad flap endonucleasa de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas y cladograma deducido de la secuencia aminoacídica de TcFEN1 de <i>T. cruzi</i> con FEN1 de diversos organismos.....	49
Figura 8. Modelamiento molecular de TcFEN1	51
Figura 9. Expresión de HIS-TcFEN1 en <i>E. coli</i>	53
Figura 10. Expresión, purificación y actividad flap endonucleasa de la proteína recombinante HIS-TcFEN1-GFP	54

Figura 11. HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS poseen actividad flap endonucleasa, la que es sensible al congelamiento..... 55

Figura 12. Actividad enzimática de TcFEN1-GFP-HIS a distintas concentraciones de la enzima 56

Figura 13. La proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP se localiza en el núcleo de epimastigotes de *T. cruzi* 58

Figura 14. La localización subcelular de HIS-TcFEN1-GFP no se altera ante la exposición a H₂O₂ 59

Figura 15. La exposición sostenida a H₂O₂ no altera la localización subcelular de HIS-TcFEN1-GFP 60

Figura 16. La sobreexpresión de HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS aumenta la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*..... 61

Figura 17. Viabilidad de epimastigotes que sobreexpresan TcFEN1 sometidos a estrés oxidativo agudo..... 63

Figura 18. Viabilidad de epimastigotes que sobreexpresan TcFEN1 sometidos a estrés oxidativo sostenido por 2 y 4 h 64

Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos usados 35

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AMA	Amastigote
AP	<i>Apurinic/aprimidinic</i> , apurínico/apirimidínico (sitio)
APE	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease</i> , endonucleasa apurínica/apirimidínica
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adenosina trifosfato
BER	<i>Base excision repair</i> , vía de reparación por escisión de bases
Cdc	<i>Cell division cycle</i> (protein), proteína del ciclo de división celular
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> , 4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
DTT	<i>Dithiothreitol</i> , ditiotreitól
EPI	Epimastigote
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino
FEN	<i>Flap endonuclease</i> , flap endonucleasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína fluorescente verde
h	Hora
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> , ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HIS o his	Histidina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
INF	Interferón
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> , Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	kilo Dalton

LIT	<i>Liver infusión tryptose</i> , infusión de hígado triptosa
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i> , ácido <i>2-(N-morfolino)etanosulfónico</i>
min	Minuto
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> , bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NIR	<i>Nucleotide incisión repair</i> , vía de reparación por incisión de nucleótidos
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , señal de localización nuclear
•NO	Óxido nítrico
Nth	<i>Endonuclease III</i> , endonucleasa III (glicosilasa)
OAS	<i>Oxidated AP sites</i> , sitios AP oxidados
OH•	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
Orc	<i>Origin recognition complex (protein)</i> , proteínas del complejo de reconocimiento del origen de replicación
O ₂ • ⁻	Anión superóxido
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , suero fisiológico tamponado con fosfato
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> , antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PI	<i>Propidium iodide</i> , yoduro de propidio
RNS	<i>Reactive Nitrogen species</i> , especies reactivas del Nitrógeno
ROS	<i>Reactive Oxygen species</i> , especies reactivas del Oxígeno
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio
TRIPO	Tripomastigote
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozoo parásito, agente causal de la enfermedad de Chagas, endémica en el continente americano. Presenta un ciclo de vida complejo, infectando tanto hospederos mamíferos como insectos triatomíneos (hematófagos) y presentando cuatro formas celulares: tripomastigotes sanguíneos, epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes metacíclicos. En humanos, la infección por *T. cruzi* en etapas avanzadas puede provocar serios trastornos cardíacos y digestivos, con un alto costo médico, y que pueden ser mortales de no ser tratados adecuadamente. Hasta el momento, no existe una cura definitiva para la infección crónica por *T. cruzi*.

Este parásito sobrevive al efecto de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) generadas tanto por células del hospedero mamífero como por la digestión de la sangre en el insecto hematófago. Se ha propuesto que estas especies reactivas dañan el DNA del parásito y que éste sobrevive activando el mecanismo de reparación del DNA por escisión de bases (vía BER). Este es un proceso muy conservado, que presenta dos sub-vías: la vía corta, en la que se reemplaza un nucleótido, o la vía larga, donde se insertan dos o más nucleótidos. En esta vía de reparación del DNA participan distintas enzimas, como DNA glicosilasas, AP endonucleasas (APE), DNA polimerasas, flap endonucleasas (FEN1) y DNA ligasas. Hasta el momento, se ha demostrado que: 1) el DNA del

parásito es dañado por ROS/RNS; 2) *T. cruzi* tiene la capacidad de reparar el daño producido por estas especies reactivas; 3) metoxiamina, un inhibidor de AP endonucleasas, aumenta la muerte celular provocada por ROS/RNS; 4) el parásito tiene dos DNA glicosilasas y dos AP endonucleasas activas. A la fecha de realización de esta Tesis no se había definido la presencia de flap endonucleasas así como de las diferentes vías (corta y/o larga) de reparación del DNA por escisión de bases en *T. cruzi*.

Las enzimas flap endonucleasas (FEN1) se caracterizan por reconocer sustratos de DNA con estructuras específicas, que se generan en diversos procesos celulares, como la replicación del DNA o su reparación mediante la vía larga del mecanismo BER. Estudios en diversos eucariontes han demostrado su importancia en la reparación del daño oxidativo al DNA, así como en la mantención de la integridad genómica.

En esta Tesis se investigó la presencia y actividad de una enzima flap endonucleasa de *T. cruzi* (TcFEN1), su expresión, su localización celular y su rol en la proliferación y en la sobrevivencia del parásito frente a condiciones de estrés oxidativo. Se demostró la presencia de actividad flap endonucleasa en distintas formas celulares de *T. cruzi* y se describieron algunas de sus propiedades. Paralelamente se encontró una secuencia correspondiente a una flap endonucleasa en el genoma publicado de *T. cruzi*, a partir de la cual se crearon plásmidos que permitieron la expresión en epimastigotes de *T. cruzi* de proteínas

de fusión TcFEN1-GFP que también presentaron actividad flap endonucleasa y que se localizaron en el núcleo de epimastigotes del parásito, según estudios de microscopia de fluorescencia. Por otro lado, se observó un incremento en la proliferación de los epimastigotes que expresaban TcFEN1-GFP, así como una mayor sobrevivencia frente a la exposición sostenida a H₂O₂ respecto a lo observado en parásitos control. En base a los resultados obtenidos, TcFEN1 se presenta como protagonista en procesos claves para la infección por *T. cruzi* como son la proliferación y resistencia frente a daño oxidativo, por lo que desarrollar inhibidores específicos de TcFEN1 podría potenciar el efecto citotóxico del daño oxidativo al DNA generado por las células del hospedero, así como potenciar el tratamiento de la infección por *T. cruzi* por drogas convencionales, actualmente muy poco eficientes en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is a protozoan parasite, the etiological agent of Chagas's disease, endemic in the American continent. It presents a complex life cycle, infecting both mammalian and triatomine insects and presenting four cellular forms: blood trypomastigote, epimastigote, amastigote and metacyclic trypomastigote. In humans, *T. cruzi* infection in advanced stages can cause serious cardiac and digestive disorders, with a high medical cost, and can be fatal if not treated properly. To date, there is no definitive cure for chronic *T. cruzi* infection.

This parasite survives the effect of reactive oxygen and nitrogen species (ROS / RNS) generated by both mammalian host cells and by the digestion of blood in the hematophagous insect. It has been proposed that those reactive species damage the DNA of the parasite but it survives by activating the mechanism of DNA repair by base excision (BER pathway). This is a highly conserved process, which has two sub-pathways: the short one, where a single nucleotide is replaced, or the long one, where two or more nucleotides are inserted. Different enzymes, such as DNA glycosylases, AP endonucleases (APE), DNA polymerases, flap endonucleases (FEN1) and ligases are involved in that DNA repair pathway. To date, it has been shown that: 1) the DNA of the parasite is damaged by ROS / RNS; 2) *T. cruzi* repairs the damage produced by

these reactive species; 3) methoxyamine, an inhibitor of AP endonucleases, increases ROS/RNS-induced parasite cell death and 4) *T. cruzi* presents two DNA glycosylases and two active AP endonucleases. At the date of this thesis, the presence of the different pathways (short and / or long) of DNA repair by base cleavage in *T. cruzi* had not been defined.

Flap endonuclease enzymes (FEN1) are characterized by recognizing DNA substrates with specific structures, which are generated in various cellular processes, such as DNA replication or repair by the long path of the BER mechanism. Studies in various eukaryotes have demonstrated their importance in the repair of oxidative damage to DNA, as well as in the maintenance of genomic integrity.

In this thesis the presence and activity of a *T. cruzi* flap endonuclease enzyme (TcFEN1), its expression, its cellular localization and its role in the proliferation and survival of the parasite against oxidative stress conditions were investigated. The presence of TcFEN1 was demonstrated in different cellular forms of *T. cruzi* and some of its properties were described. In parallel, a sequence corresponding to a flap endonuclease was found in the published *T. cruzi* genome, from which plasmids were created that allowed expression in *T. cruzi* epimastigotes of TcFEN1-GFP fusion proteins that also had flap endonuclease activity and were located in the epimastigotes nucleus, according to fluorescence microscopy. On the other hand, there was an increase in the

proliferation of epimastigotes expressing TcFEN1-GFP, as well as a higher survival to H₂O₂ sustained exposure than observed in control parasites. Based on the results obtained, TcFEN1 is presented as a protagonist in key processes for infection by *T. cruzi*, such as proliferation and resistance to oxidative damage. Therefore, the development of specific inhibitors of TcFEN1 may enhance the cytotoxic effect of oxidative DNA damage generated by the host cells, as well as potentiate the treatment of *T. cruzi* infection by conventional drugs, currently very ineffective in the treatment of chronic Chagas' disease.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas

La familia Trypanosomatidae está compuesta por numerosos parásitos de plantas y animales, presentando relevancia tanto a nivel de medicina humana como en el ámbito médico veterinario y fitosanitario (Tyler & Engman, 2001; De Souza 2002; Teixeira *et al.*, 2006, 2011). Entre los miembros de esta familia se encuentra *Trypanosoma cruzi*, parásito endémico del continente americano, que posee un ciclo de vida complejo en el cual se encuentran involucrados tanto hospederos mamíferos como insectos triatominos (hematófagos).

El ciclo de vida del parásito comienza cuando un insecto hematófago de la subfamilia Triatominae se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiriendo tripomastigotes, la forma infectiva sanguínea no replicativa del parásito. Una vez que llegan al intestino anterior del insecto triatomino, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, la forma celular replicativa no infectiva del parásito (Tyler & Engman, 2001; De Souza, 2002; Lima *et al.*, 2010). Estos epimastigotes proliferan y se desplazan hacia la ampolla rectal (el final del tracto digestivo del insecto), donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva no replicativa de *T. cruzi*. Cuando el insecto triatomino infectado se alimenta de un hospedero vertebrado, elimina al mismo tiempo sus deyecciones contaminadas con estas formas metacíclicas del parásito. Debido

al prurito que experimenta el mamífero como consecuencia de la picadura, desplaza mecánicamente las deyecciones hacia el sitio de alimentación del insecto, permitiendo que los tripomastigotes metacíclicos presentes en las deyecciones ingresen a los estratos basales de la piel del hospedero mamífero (Tyler & Engman, 2001; De Souza, 2002; Lima *et al.*, 2010). Estos tripomastigotes invaden las células locales, ingresando a una vesícula parasitófora de la cual escapan alcanzando el citoplasma de la célula infectada, diferenciándose a amastigotes, la forma replicativa intracelular del parásito. (De Souza, 2002; Peluffo *et al.*, 2004; Piacenza *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010). Los amastigotes proliferan y posteriormente se diferencian nuevamente a tripomastigotes sanguíneos, lisando la célula que los albergaba. Estas formas celulares pueden migrar por vía linfática o sanguínea e infectar diversos órganos y tejidos en el hospedero mamífero. El ciclo se inicia nuevamente cuando un insecto triatomino se alimenta del hospedero mamífero infectado (Lima *et al.*, 2010). En la **Figura 1** se muestra un esquema con las diversas etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*.

En los seres humanos, la infección con *T. cruzi* causa la enfermedad de Chagas, endémica de América Latina. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO) alrededor de 8 millones de personas actualmente están infectadas con el parásito, existiendo además alrededor de 28 millones más en situación de riesgo de contraer la infección (WHO, 2017). Si bien la mayoría de las personas infectadas se encuentran en América Latina, fenómenos

migratorios, transfusiones de sangre contaminada, trasplantes de órganos y transmisión vía placentaria han contribuido a que se detecten personas infectadas en diversos lugares del mundo (Schmunis & Yadon, 2010; Teixeira *et al.*, 2011). En Estados Unidos, donde la enfermedad no es considerada endémica, se han identificado a más de 300.000 personas infectadas con el parásito (Bern & Montgomery, 2009).

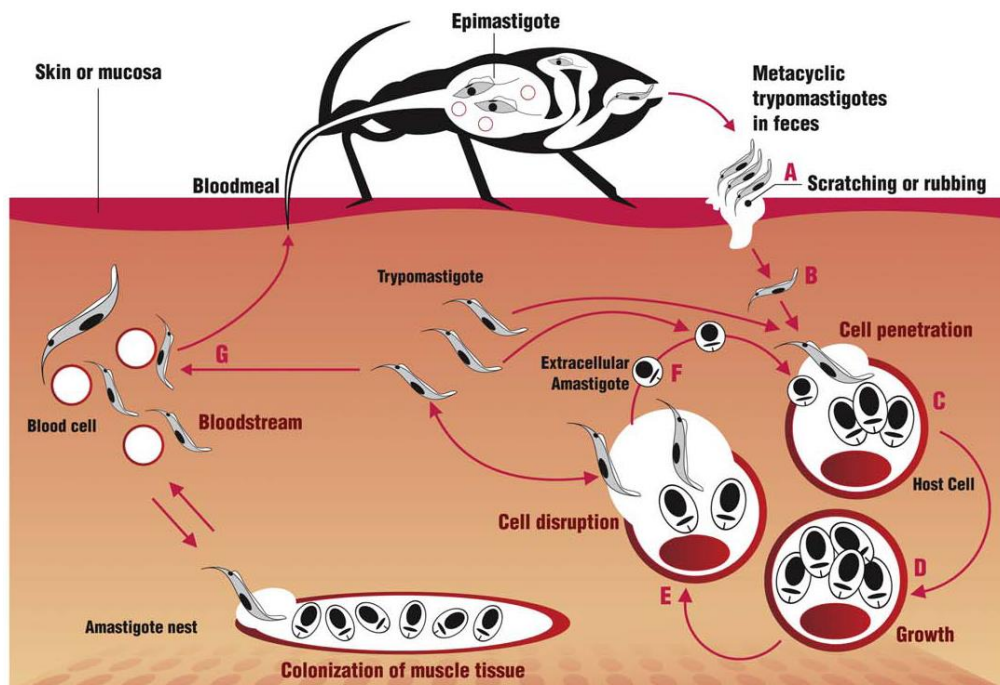


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se observan las distintas etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*, tanto en el hospedero mamífero como en el insecto triatómico (tomado de Lima *et al.*, 2010).

La enfermedad de Chagas se presenta en tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda o inicial comienza luego que el parásito ingresa al hospedero humano, se prolonga por aproximadamente 2 meses luego de la

infección y en un 95% de los casos es asintomática. En esta fase es posible detectar a los tripomastigotes en la sangre por medio de microscopía óptica, así como por la presencia de anticuerpos específicos (IgM) contra antígenos parasitarios (Teixeira *et al.*, 2006, 2011). Si bien la mortalidad en esta fase es muy baja, se han reportado casos de individuos fallecidos, principalmente debido a fallas cardíacas severas, encefalitis o meningitis (Teixeira *et al.*, 2006, 2011).

La fase indeterminada se caracteriza por la ausencia de signos o síntomas de la enfermedad. Si bien en esta fase es difícil encontrar tripomastigotes circulantes en la sangre, los exámenes serológicos pueden evidenciar la presencia de IgGs contra antígenos de *T. cruzi*. Las personas que cursan esta fase son portadoras y sirven de reservorio para el parásito (aproximadamente dos tercios del total), permaneciendo asintomáticos por el resto de su vida (Peluffo *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006, 2011).

Se estima que un tercio de las personas en la fase indeterminada de la enfermedad pueden llegar a presentar manifestaciones clínicas más severas, pasando a la denominada fase crónica. Los principales signos observables en esta fase corresponden a problemas cardíacos y/o digestivos derivados de la presencia de la forma amastigote del parásito en la musculatura cardíaca y digestiva, así como en los ganglios que las inervan (Teixeira *et al.*, 2011). En el corazón se producen lesiones inflamatorias debido a la presencia de infiltración por células del sistema inmune, que eventualmente provoca hipertrofia cardíaca,

disfunciones cardíacas e incluso muerte súbita (Teixeira *et al.*, 2006, 2011; Calvet *et al.*, 2012). En el sistema digestivo, las alteraciones afectan la motilidad del esófago e intestino grueso, generando cuadros de megaesófago o megacolon. Las personas afectadas presentan dificultades en la deglución, regurgitación de alimentos, epigastralgia, eliminación espontánea de material fecal o constipación (Teixeira *et al.*, 2011).

A la fecha, no existe una vacuna contra *T. cruzi*, por lo que la principal forma de prevenir la enfermedad de Chagas continúa siendo el control vectorial, disminuyendo la exposición de la población al contacto con los insectos triatomínicos, además de un adecuado control sobre los donantes de sangre y órganos (WHO, 2017). Por otro lado, la gran cantidad de animales reservorios e insectos triatomínicos que pueden albergar al parásito impiden la erradicación de la enfermedad de forma definitiva (Teixeira *et al.*, 2011).

El tratamiento farmacológico de la enfermedad recae principalmente sobre dos fármacos, nifurtimox y benznidazol. Estos han demostrado buena efectividad cuando son administrados en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, una vez que se ha establecido la infección estos fármacos resultan ineficaces (Teixeira *et al.*, 2011). Además provocan numerosos efectos secundarios molestos para el paciente, lo que limita en parte su uso. Otros fármacos usados están dirigidos más bien a controlar los síntomas de la enfermedad. La falta de una cura efectiva para la infección crónica con *T. cruzi*, sumada a la carencia de

vacunas y la imposibilidad de erradicar al parásito de forma definitiva, hacen a la enfermedad de Chagas un importante problema de salud pública, más aún cuando gran parte de la población en riesgo de contraer la enfermedad pertenece a grupos sociales de escasos recursos.

1.2 *T. cruzi* y resistencia a estrés oxidativo

T. cruzi, en sus distintas formas celulares, ya sea dentro del hospedero mamífero como en el insecto triatomino, está sometido a estrés oxidativo. Esta condición se puede definir como un desbalance entre la exposición a agentes oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante. En el caso de *T. cruzi*, el parásito está expuesto a agentes oxidantes que pueden provocar esta condición, originados tanto intracelular como extracelularmente (Cardoni *et al.*, 1997; Graca-Souza *et al.*, 2006; Piacenza *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2011). Si bien estos agentes oxidantes reaccionan con macromoléculas de diversa naturaleza, como lípidos, proteínas, etc., el daño al DNA puede resultar particularmente perjudicial para el parásito, debido a la posibilidad de generar lesiones que interfieran con procesos celulares fundamentales, o que posean un alto potencial citotóxico o mutagénico (Demple *et al.*, 2002, Gros *et al.*, 2002).

La mayor fuente de ROS intracelular en la mayoría de las células eucariontes se encuentran relacionados con la mitocondria (Paes *et al.*, 2011). La reducción parcial del oxígeno molecular durante la respiración origina

diversas ROS, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}). Como es característico de los miembros de la familia Trypanosomatidae, *T. cruzi* posee una sola gran mitocondria, donde el DNA mitocondrial se encuentra formando una compleja estructura de círculos, denominada kinetoplasto (De Souza, 2002). Dada la cercanía del DNA mitocondrial con las fuentes de ROS y la ausencia de estructuras que puedan proteger este genoma, como es el caso de los nucleosomas en el núcleo, el DNA mitocondrial puede ser especialmente afectado por daño oxidativo (Liu *et al.*, 2008). Respecto al DNA nuclear, éste también puede ser dañado por la producción intracelular de ROS, aunque la organización nuclear de *T. cruzi* presenta características particulares que podrían alterar la forma en la que el DNA nuclear resulte afectado. Si bien su cromatina se organiza en nucleosomas (Hecker *et al.*, 1994), ésta no se condensa en cromosomas durante la división (Solari, 1980a, 1980b) y sus histonas presentan divergencias en sus secuencias y estructuras respecto a lo observado en otros organismos (Galanti *et al.*, 1998). Muchas de las proteínas presentes en la replicación del DNA, como PCNA, Orc1/Cdc6, topoisomerasas, kinasas y ciclinas están también presentes en el parásito, aunque éstas presentan características propias que las diferencian de sus homólogas en otros organismos (Fragoso *et al.*, 1998; Calderano *et al.*, 2011; Li, 2012; Tiengwe *et al.*, 2014; Calderano *et al.*, 2015).

Por otro lado, las diferentes formas celulares de *T. cruzi* están expuestas a distintas fuentes de ROS y RNS extracelulares. Investigaciones realizadas en

epimastigotes presentes en el intestino anterior del hospedero triatomino señalan que los parásitos se encuentran expuestos a la generación de ROS producto de la degradación de la hemoglobina y la consecuente liberación de grupos hemo y Fe^{+2} (Graca-Souza *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2011). Este último es capaz de generar ROS por medio de la reacción de Fenton. Por otra parte, las formas tripomastigotas del parásito presentes en las vacuolas parasitóforas formadas en el hospedero mamífero deben lidiar con ROS/RNS generados por los macrófagos y otras células del sistema inmune del hospedero en respuesta a la infección por *T. cruzi*, proceso denominado estallido respiratorio (Cardoni *et al.*, 1997; Piacenza *et al.*, 2009). Así, los macrófagos al internalizar a los tripomastigotes en vesículas parasitóforas, reclutan y ensamblan en la membrana del fagosoma el complejo NADPH oxidasa, responsable de la generación de grandes cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$, el que posteriormente puede llevar a la formación de H_2O_2 y OH^{\cdot} . Además, macrófagos activados por citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, INF- γ , TNF- α) producen grandes cantidades de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), el que al difundir hacia la vesícula parasitófora puede reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$ para producir peroxinitrito (ONOO^-), un poderoso agente oxidante altamente reactivo, capaz de generar daño tanto directamente o por medio de la generación de otras especies oxidantes (Piacenza *et al.*, 2009). Por otro lado, los amastigotes de *T. cruzi* que se encuentran en el citoplasma de los cardiomiocitos en las fases indeterminada y crónica de la enfermedad, se enfrentan a un ambiente altamente oxidante debido principalmente a una disfunción

mitocondrial de las células cardíacas que incrementa la generación de ROS (Gupta *et al.*, 2009). Finalmente, la presencia de nidos de amastigotes en los tejidos provoca la infiltración de células del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos con la generación de una respuesta inflamatoria en la zona afectada (Teixeira *et al.*, 2011; Calvet *et al.*, 2012).

Para poder sobrevivir a estas condiciones adversas en los distintos ambientes a los que *T. cruzi* está expuesto durante su ciclo de vida, el parásito ha desarrollado una serie de mecanismos y defensas antioxidantes que le permiten enfrentar al estrés oxidativo. Sin embargo, el parásito no posee los sistemas antioxidantes glutatión/glutatión reductasa y tioredoxina/tioredoxina reductasa, así como tampoco las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, presentes en vertebrados. La ausencia de estos sistemas antioxidantes llevó a postular que *T. cruzi* no era capaz de lidiar de forma efectiva con ROS/RNS. No obstante, actualmente se sabe que el parásito posee sistemas antioxidantes alternativos muy eficaces para la eliminación de agentes oxidantes, que corresponden al sistema ditiol tripanotion y su reductasa, dos peroxiredoxinas y varias peroxidasas distintas, algunas de las cuales presentan homología de secuencia con la enzima glutatión peroxidasa de mamíferos (Graca-souza *et al.*, 2006; Piacenza *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2011). Además, *T. cruzi* presenta una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato y al menos 4 superóxido dismutasas dependientes de Fe (Piacenza *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2011). Indagaciones realizadas en este contexto señalan que existe un incremento en la síntesis de

varias de estas enzimas antioxidantes en la transformación desde epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos infectivos. Se ha observado que este aumento en la cantidad de enzimas antioxidantes es mayor en las cepas más infectivas del parásito (Piacenza *et al.*, 2009), hecho que relaciona la importancia de los sistemas antioxidantes parasitarios en la sobrevivencia de *T. cruzi* con su capacidad de realizar una infección efectiva del hospedero mamífero.

A pesar de la eficiencia de los diversos mecanismos antioxidantes que presenta *T. cruzi*, la respuesta inmune de los hospederos mamíferos es capaz en un primer momento de controlar la infección, eliminando gran parte de los parásitos. En consecuencia, para el establecimiento de la infección es necesario que algunos parásitos sobrevivan a la respuesta inmune local inicial (Piacenza *et al.*, 2009). Esto sugiere la presencia y activación de mecanismos de reparación del daño causado por los diversos agentes oxidantes. Dado que lesiones en el DNA nuclear o mitocondrial son extremadamente citotóxicas cuando no son reparadas de forma eficiente (Gros *et al.*, 2002), los mecanismos de reparación del DNA en *T. cruzi* deberían presentar gran relevancia en la sobrevivencia del parásito, así como en su capacidad de establecer una infección exitosa.

1.3 Estrés oxidativo, daño al DNA y mecanismos de reparación

ROS y RNS pueden dañar el DNA de forma directa o indirecta, provocando cambios tanto en las bases como en la desoxirribosa. Como consecuencia, se

genera una gran variedad de bases y residuos de azúcar modificadas. Estas lesiones no son abultadas o de gran tamaño y en su gran mayoría son reparadas por la vía de reparación por escisión de bases (BER), un mecanismo de reparación conservado evolutivamente (Dianov *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001; Demple *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2009). Este mecanismo de reparación también ha sido detectado en la reparación del DNA mitocondrial (Boesch *et al.*, 2011).

En mamíferos, la vía BER se inicia con el reconocimiento de una base dañada por una DNA glicosilasa, que cataliza la escisión de la base dañada al cortar el enlace N-glicosídico, generando un sitio abásico apurínico/apirimidínico (sitio AP). Las glicosilasas pueden ser monofuncionales o bifuncionales; estas últimas además de la actividad glicosilasa poseen actividad AP liasa, que les permite cortar en la región 3' del sitio AP, dejando como resultado un residuo 3'-aldehído α/β insaturado y un 5'-fosfato. Posteriormente, una endonucleasa AP hidroliza el enlace 5' fosfodiéster exponiendo en el DNA sitios 3'-OH y 5'-deoxirribosa-5'- fosfato (5'-fosfato en caso de haber actuado una glicosilasa bifuncional). En el siguiente paso, el residuo de azúcar fosfato remanente, si ha actuado una glicosilasa monofuncional, es removido por una DNA polimerasa mediante su actividad 5'-desoxirribosa-5'-fosfato liasa. Una vez que en el DNA se exponen los sitios 3'-OH y 5'-fosfato, la DNA polimerasa inserta el nucleótido correcto mediante complementariedad de bases y finalmente una DNA ligasa completa la reparación, ligando los extremos. Esta secuencia es conocida como

la “vía BER corta” (Lu *et al.*, 2001; Demple *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2009). En la llamada “vía BER larga”, la DNA polimerasa inserta más de un nucleótido, desplazando una de las hebras de DNA, creando una especie de alerón o “flap” en inglés. Este flap es reconocido y eliminado por una endonucleasa estructura-específica, FEN1 (flap endonucleasa 1), la cual deja un extremo 5`-fosfato que permite la actividad de la DNA ligasa que termina de reparar los extremos del DNA (Demple *et al.*, 2002, Gros *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2001, Robertson *et al.*, 2009). En la **Figura 2** se muestran ambas sub-vías de BER, con las enzimas que han sido identificadas en mamíferos y que participan en estas vías de reparación del DNA en el núcleo y en la mitocondria.

Los sitios AP, generados por la acción de las DNA glicosilasas o por pérdida espontánea de bases en el DNA (unas 10.000 por célula/día aprox.) (Haltiwanger *et al.*, 2000), son altamente genotóxicos y deben ser reparados rápidamente (Gros *et al.*, 2004). Estos sitios AP al no ser procesados prontamente, pueden sufrir oxidaciones posteriores, generándose modificaciones en los residuos de desoxirribosa que en algunos casos provocan quiebres de hebras simples de DNA (Lu *et al.*, 2001; Demple *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2002). Por otra parte, los sitios AP oxidados (OAS) pueden formar aductos estables con enzimas de la vía BER que posean actividad AP liasa o 5`-desoxirribosa-5`-fosfato liasa, como es el caso de la DNA polimerasa β . Estos aductos DNA-proteína también son altamente nocivos y pueden llevar a quiebres de hebras de DNA, así como a alteraciones de diversos procesos celulares (Demple *et al.*, 2002; Gros *et al.*,

2002). En general, los OAS pueden ser reparados mediante la vía BER larga, desplazando la hebra de DNA que contiene el residuo de azúcar oxidado mediante la actividad de la DNA polimerasa y luego eliminado el flap generado por medio de la actividad de FEN1 (Dempfle *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2002).

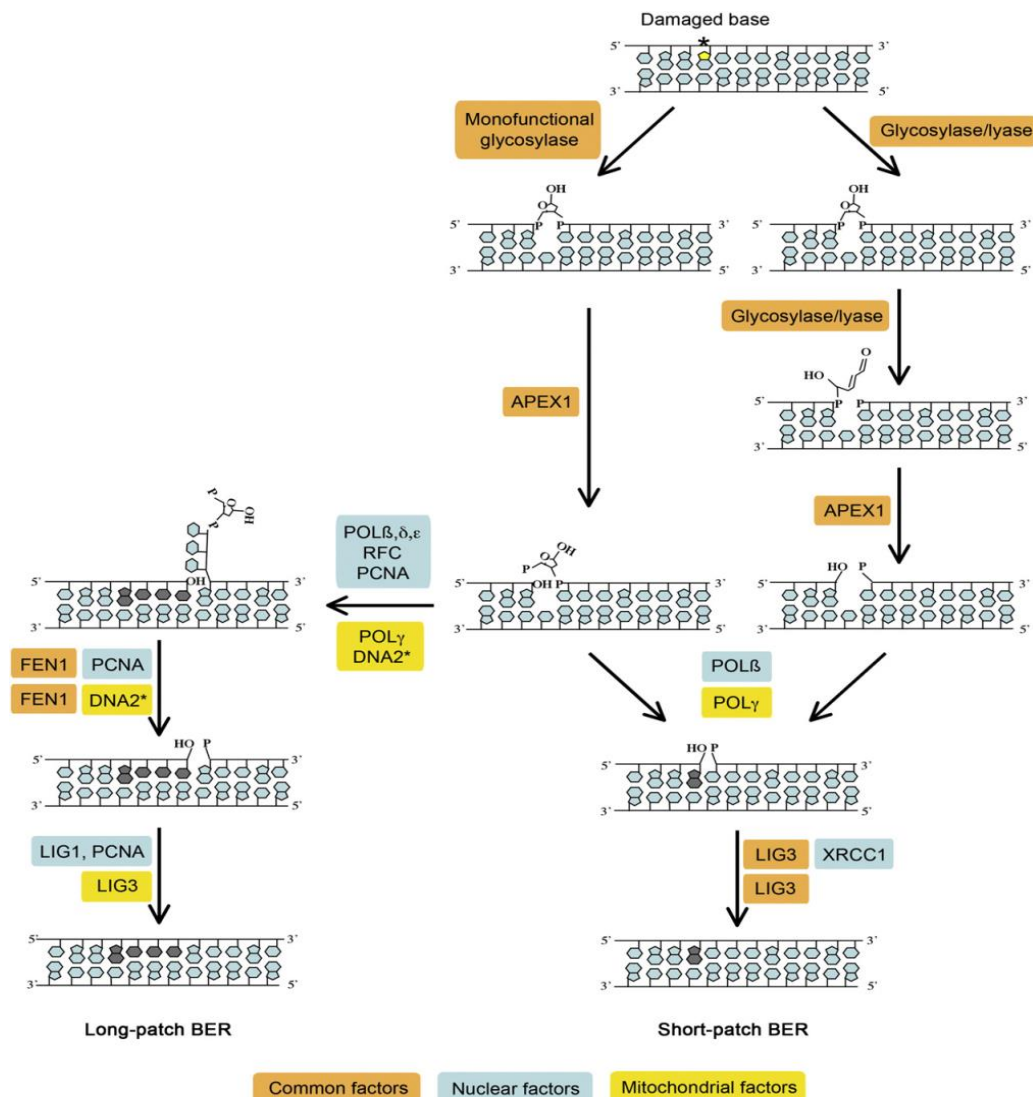


Figura 2. Vía BER en mamíferos. Se observan las dos sub-vías de BER, con las enzimas que participan en ella, así como los sustratos reconocidos por cada enzima. Además, se muestran las enzimas descritas para la vía BER comunes y exclusivas de núcleo y de mitocondria (Tomado de Boesch *et al.*, 2011).

Otra vía de reparación alternativa a la vía BER relacionada con la eliminación de bases oxidadas, corresponde a la reparación del DNA por incisión de nucleótidos (NIR), la cual también es evolutivamente conservada (Ischenko *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2004). En esta vía, una endonucleasa apurínica/apirimidinica (APE1 en humanos) reconoce directamente bases oxidadas y realiza un corte en el enlace 5`-fosfodiéster del sitio alterado, dejando un extremo 3`-OH y otro extremo 5`-fosfato, que pertenece al nucleótido que presenta la base modificada. En este punto, la vía se bifurca: en algunos casos FEN1 retira el nucleótido con la base oxidada, tras lo cual una DNA polimerasa (DNA polimerasa β) introduce el nucleótido faltante para que posteriormente una DNA ligasa termine la reparación. En otros casos, la DNA polimerasa agrega varios nucleótidos y desplaza al nucleótido con la base dañada en un flap, que posteriormente es eliminado por FEN1. Finalmente, una DNA ligasa termina la reparación (Ischenko *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2004).

La vía NIR sirve como respaldo a la vía BER, es independiente de glicosilasas y presenta la característica de no generar sitios AP que puedan sufrir más modificaciones. Ambas vías, BER y NIR, comparten diversos factores y enzimas, como APE1, DNA polimerasa β , FEN1, algunas ligasas y PCNA (Ischenko *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2004).

1.4 Reparación en *T. cruzi* del daño al DNA causado por agentes oxidantes

En *T. cruzi*, se han identificado diversas enzimas que participan en múltiples vías de reparación del DNA. Se ha reportado la presencia en el parásito de diversas enzimas que participan en la vía BER, como DNA glicosilasas, AP endonucleasas y una DNA polimerasa β (Passos-Silva *et al.*, 2010; Furtado *et al.*, 2012; Sepúlveda *et al.*, 2014; Machado-Silva *et al.*, 2016; Ormeño *et al.*, 2016). Por otro lado, indagaciones realizadas por Cabrera *et al.*, 2011, señalan que agentes oxidantes como H_2O_2 y $ONOO^-$ son capaces de provocar daño al DNA nuclear y mitocondrial de epimastigotes y tripomastigotes, disminuyendo la viabilidad parasitaria (Cabrera *et al.*, 2011). El daño al DNA generado es capaz de ser reparado por algunos parásitos. Sin embargo, al incubarse epimastigotes y tripomastigotes simultáneamente con ROS/RNS y el inhibidor de la vía BER metoxiamina, la disminución en la viabilidad se incrementa (Cabrera *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que la vía BER se encuentra activa en *T. cruzi*.

La secuenciación del genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) ha permitido la búsqueda de secuencias codificantes ortólogas de proteínas de la vía BER de mamíferos. Una de las enzimas de esta vía anotadas en las bases de datos del genoma es FEN1 de *T. cruzi* (TcFEN1). Esta enzima podría tener gran relevancia en la reparación del daño oxidativo del DNA, participando tanto en las vías BER y NIR, teniendo un papel importante en la resistencia del parásito

sometido a estrés oxidativo. Sin embargo, hasta el presente no ha sido estudiada.

1.5 Flap endonucleasas y resistencia al daño oxidativo en el DNA

FEN1 pertenece a una superfamilia de metalonucleasas capaces de reconocer y procesar sustratos de DNA estructura-específicos, que se generan en diversos procesos celulares relativos al metabolismo del DNA. Esta enzima ha sido estudiada en numerosos organismos, permaneciendo evolutivamente conservada (Liu *et al.*, 2004; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan & Bambara, 2013). FEN1 posee 3 actividades enzimáticas distintas, siendo su actividad flap endonucleasa la más característica. Esta actividad consiste en el reconocimiento de sustratos de DNA de doble hebra que presenten un flap 5' no alineado. Este último es eliminado por FEN1 a través de un corte endonucleolítico en la base del flap (ver **Figura 2** y **Figura 3**). FEN1 posee además actividad 5'-exonucleasa y actividad gap endonucleasa; por lo tanto, es capaz de degradar nucleótidos de forma progresiva a partir de un "nick" o un "gap" en el DNA (Liu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan & Bambara, 2013). Las distintas actividades enzimáticas de FEN1 participan en la mantención de la integridad del DNA mediante diversos mecanismos, posicionando a FEN1 como un importante factor de la estabilidad genómica (Liu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan

& Bambara, 2013). Entre sus principales funciones está su participación en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la replicación del DNA y su participación en la vía BER larga, ambas mediante su actividad flap endonucleasa (Liu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan & Bambara, 2013). También se ha demostrado su participación en la vía NIR de reparación (actividad flap endonucleasa) y ha sido implicada en la mantención de la estabilidad de los telómeros, rescate de horquillas de replicación trabadas y fragmentación del DNA durante la apoptosis, procesos en los que adquieren importancia sus actividades 5'-exonucleasa y gap endonucleasa (Gros *et al.*, 2002, 2004; Liu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011).

En general, ortólogos de FEN1 encontrados en diversos organismos corresponden a proteínas de entre 44 a 50 kDa, presentando una dependencia de metales divalentes como Mg^{+2} o Mn^{+2} para la catálisis enzimática, los que no pueden ser sustituidos por Ca^{+2} o Zn^{+2} . FEN1 requiere de dos cationes bivalentes para la catálisis. El pH óptimo para la enzima FEN1 de mamíferos es 8 (Harrington & Lieber, 1994; Liu *et al.*, 2004). La estructura general de las flap endonucleasas de distintos organismos es bastante conservada (**Figura 3B**), constando de 3 dominios: uno N-terminal (N), uno intermedio (I) y otro C-terminal (C). Estos dominios forman una estructura en forma de sillín. El sitio activo de FEN1 se encuentra cercano a la base del arco en hélice (I) y está formado por una zona rica en carboxilatos, que son los encargados de unir los metales divalentes (**Figura 3B**). En eucariontes son 7 carboxilatos bien conservados,

mientras que en bacteriófagos y arqueas son 8 (Liu *et al.*, 2006; Tomlinson *et al.*, 2010; Tsutakawa *et al.*, 2011). Tanto los dominios N como I presentan una alta homología según lo observado al comparar FEN1 de arqueas, bacteriófagos, levaduras y mamíferos (Liu *et al.*, 2004). La cola C-terminal participa de interacciones con otras proteínas que regulan su actividad, como PCNA (Tomlinson *et al.*, 2010; Tsutakawa *et al.*, 2011). Diversos estudios realizados con Rad27 recombinante (homólogo de FEN1 en *S. cereviceae*) (Kao *et al.*, 2002) y FEN1 humana recombinante (hFEN1) (Shen *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 2002, 2004) han demostrado que el sustrato óptimo para la actividad flap endonucleasa corresponde al denominado de “doble flap”, un flap 3` de 1 nucleótido y el flap 5` de largo variable, como se observa en la **Figura 3A**.

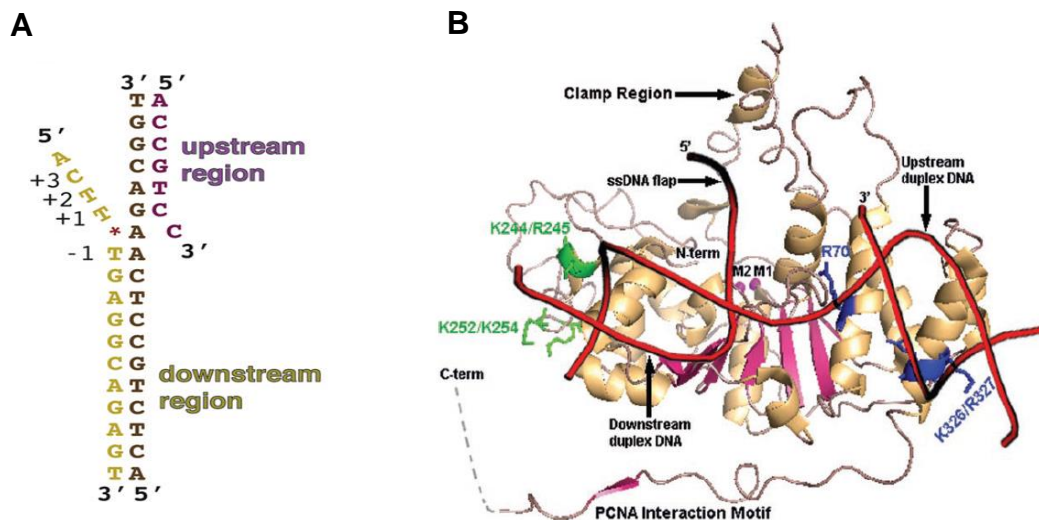


Figura 3. Sustrato modelo para la actividad flap endonucleasa y estructura de hFEN1. A) Se observa la estructura de un sustrato de DNA doble hebra del tipo “doble flap” (Tomado de Tsutakawa *et al.*, 2011). **B)** Modelo estructural de hFEN1 unido a un sustrato de “doble flap” (Tomado de Liu *et al.*, 2006).

La unión a la zona de doble hebra río abajo del sitio de corte en el sustrato ocurre en el dominio C, a través de un motivo modificado de interacción con DNA de doble hebra no específico, denominado “hélice-triple vuelta-hélice” (H3TH), una variante del motivo “hélice-horquilla-hélice”. El DNA doble hebra o monohebra río arriba del sitio de corte en el sustrato es unido por el dominio N y es doblado en un ángulo de 90° respecto a la hebra río abajo. La zona 5' monohebra (flap) pasaría a través del arco formado por el dominio I, el que actuaría como una suerte de abrazadera (clamp) (Sakurai *et al.*, 2005; Tomlinson *et al.*, 2010; Tsutakawa *et al.*, 2011).

Diversos estudios en distintos organismos han mostrado la importancia de FEN1 en la reparación del DNA. En *S. cereviceae* se ha descrito ausencia de la vía BER corta; sin embargo, se encuentra presente la vía BER larga. La delección de Rad27, el homólogo de FEN1 en *S. cereviceae*, provoca aumento de mutaciones espontáneas e hipersensibilidad a agentes alquilantes y radiación UV (Liu *et al.*, 2004; Asagoshi *et al.* 2010). En el protozoo *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria, se observó que la reparación de sitios AP normales y reducidos era principalmente por la vía BER larga (Haltiwanger *et al.*, 2000). Ratones knock-out para APE1, DNA polimerasa β o FEN1 son embríonicamente letales, lo que sugiere la necesidad de reparar DNA mediante la vía BER en la embriogénesis (Liu *et al.*, 2004; Asagoshi *et al.*, 2010). Células DT40 (derivadas de linfoma de pollo), knock-out para FEN1, presentan una menor tasa de replicación y mayor sensibilidad a agentes oxidantes como H₂O₂

(Asagoshi *et al.*, 2010). En líneas celulares humanas, se observó reparación de daño oxidativo al DNA mitocondrial por la vía BER larga de forma FEN1-dependiente (Liu *et al.*, 2008) y otros estudios señalan la detección de actividad flap endonucleasa en la mitocondria (Kalifa *et al.*, 2009). También en células HeLa, se observó la localización nuclear de FEN1 durante la fase S del ciclo celular y en respuesta a daño al DNA (Qiu *et al.*, 2001). Algunos estudios relacionados han determinado que la deficiencia de FEN1 o mutaciones que alteren su actividad están asociadas a inestabilidad genómica y a la predisposición a cáncer, lo que otorgaría a FEN1 características de un supresor de tumores. Por otro lado, se ha detectado en distintos tipos de células cancerígenas un aumento en la expresión de FEN1, lo que se correlaciona con la agresividad del tumor, probablemente debido al doble papel de FEN1 tanto en la replicación como en la reparación del DNA, favoreciendo el crecimiento tumoral (Zheng *et al.*, 2011).

En vista de los antecedentes expuestos, y por la importancia de FEN1 en diversos mecanismos celulares implicados en el metabolismo del DNA, como la replicación y reparación, en esta Tesis se postula que *T. cruzi* también posee una enzima con las características de una flap endonucleasa, y que esta tiene un rol en la proliferación del parásito y su resistencia frente a daño oxidativo.

2. HIPÓTESIS

Trypanosoma cruzi posee una enzima flap endonucleasa (TcFEN1) que participa tanto en la proliferación del parásito como en su resistencia al daño oxidativo

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar la expresión de la enzima flap endonucleasa de *T. cruzi* (TcFEN1) y analizar su rol en la proliferación del parásito y su sobrevivencia cuando es sometido a estrés oxidativo

3.2 Objetivos específicos

a) Detectar la actividad flap endonucleasa de *T. cruzi*

- Comprobar la presencia de actividad flap endonucleasa endógena en extractos proteicos de epimastigotes de *T. cruzi*.
- Generar un plasmidio que permita expresar la proteína de fusión TcFEN1-GFP en epimastigotes de *T. cruzi*.
- Expresar y purificar TcFEN1-GFP en condiciones nativas.
- Comprobar mediante ensayos enzimáticos *in vitro* la actividad flap endonucleasa de la enzima TcFEN1-GFP purificada.

b) Caracterizar la expresión de la enzima TcFEN1-GFP en epimastigotes de *T. cruzi* tratados y no tratados con agentes oxidantes

- Analizar por microscopía de fluorescencia la presencia de la proteína de fusión TcFEN1-GFP en el núcleo, mitocondria y/o citoplasma de los parásitos que sobreexpresan TcFEN1-GFP, en condiciones normales o expuestos a agentes oxidantes.

c) Evaluar el efecto de la sobreexpresión de TcFEN1-GFP en la proliferación de los parásitos y en su viabilidad en condiciones de estrés oxidativo

- Analizar el efecto de la sobreexpresión de TcFEN1-GFP en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, respecto a lo observado en parásitos controles (transfectados con el plasmidio vacío).
- Comparar la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* controles (transfectados con el plasmidio vacío) con parásitos que sobreexpresen TcFEN1-GFP, tratados y no tratados con agentes oxidantes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivos celulares

Epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi* fueron cultivados a 28°C en medio LIT (Liver Infusion Tryptose: 5 g/l extracto de hígado; 3,97 g/l NaCl; 0,395 g/l KCl; 3,12 g/l HPO₄Na₂, 2 g/l glucosa) (Camargo, 1964), suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 20 µg/ml hemina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Las formas tripomastigotes y amastigotes fueron obtenidas desde cultivos celulares de cardiomiocitos de rata (H9C2 (2-1), ATCC CRL-1446, *Rattus norvegicus*) infectados con el parásito. Estos cultivos fueron mantenidos en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% FBS a 37°C en 5% CO₂ como se ha descrito para células RAW 264.7 (Sepúlveda *et al.*, 2014).

Las cepas DH5α y BL21 de *Escherichia coli* fueron mantenidas y crecidas en medio LB (Luria Bertani: 10 g/l triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 2 g/l glucosa y 10 g/l NaCl) a 37°C.

Todos los cultivos fueron mantenidos de acuerdo a las instrucciones del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, así como siguiendo pautas nacionales (Bioseguridad 1ra edición, 1994, Comisión

Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, Chile) e internacionales (Manual de Bioseguridad en Laboratorios, OMS, Ginebra 2005).

4.2 Homogeneizados de *T. cruzi*

Homogeneizados de las distintas formas celulares de *T. cruzi* (epimastigote, tripomastigote y amastigote) fueron obtenidas por lisis celular en 10 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,25% Nonidet P-40, 20% glicerol, conteniendo además inhibidores de proteasas (Roche). Las muestras fueron centrifugadas a 25.000 xg por 10 min a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas de los sobrenadantes fue estimada usando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.3 Ensayos de actividad flap endonucleasa

El sustrato más eficiente para evaluar la actividad flap endonucleasa consiste en un DNA de doble hebra formado por 3 oligonucleótidos alineados entre sí, formando una estructura denominada de “doble flap” (**Figura 3A**, Kao *et al.*, 2002). Para generar un sustrato de DNA procesable por una flap endonucleasa, se generaron 3 oligonucleótidos distintos (**Figura 3** y **Tabla I**): un oligonucleótido largo (54-mer) y otros dos oligonucleótidos más cortos (35-mer y

26-mer), los que son complementarios al oligonucleótido 54-mer. El oligonucleótido 35-mer presenta en su extremo 5' una secuencia de 6 nucleótidos que no hibridan con la hebra 54-mer, por lo que forman un flap 5' no alineado. El nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido 26-mer compite por la posición de hibridación con el nucleótido previo al flap no complementario del oligonucleótido 35-mer (**Figura 4**). Esta competencia genera que en determinados momentos el nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 26-mer no se encuentre hibridado y por consiguiente se presente como un pequeño flap 3' formando la estructura de "doble flap". En la **Figura 4** se describen las secuencias de los oligonucleótidos usados y cómo alinean entre sí, formando la estructura de "doble flap".

Para determinar la actividad flap endonucleasa, el oligonucleótido 35-mer fue marcado en su extremo 5', que forma el flap de DNA no complementario, usando [γ - 32 P] ATP y el sistema comercial DNA 5' End Labeling System (Promega), hibridado con los oligonucleótidos 54-mer y 26-mer no marcados, para formar el sustrato FLAP de doble hebra. En cada ensayo o condición, 0,5 pmoles del sustrato (o la cantidad indicada) fueron incubados con 18 μ g de proteínas presentes en los homogeneizados de los parásitos, o 30 ng de proteína recombinante purificada, en 50 mM Tris pH 8,0 y 50 mM MgCl₂ por 10 o 30 min a 30°C. La cantidad de proteínas usadas en los experimentos fue previamente definida mediante ensayos utilizando distintas concentraciones de proteínas. Las reacciones fueron detenidas mediante la adición de buffer de carga de formamida (96% v/v formamida, 20 mM EDTA, 5 mM Tris pH 7,5, xileno cianol 0,05% p/v,

azul de bromofenol 0,05% p/v), seguido de incubación por 10 min a 75°C. Finalmente, las muestras se incubaron a 95°C por 5 min y fueron separadas mediante electroforesis en geles de acrilamida al 16-20% bajo condiciones desnaturalantes (7 M urea) a 65 W constantes por 30 min. Los oligonucleótidos marcados fueron detectados usando un equipo phosphorimager (BioRad). Como control negativo, se usaron los oligonucleótidos marcados no incubados con homogeneizados de los parásitos o con la proteína recombinante purificada.

OLIGONUCLEÓTIDOS DEL SUSTRATO FLAP:

Oligo 54-mer: 5'- **GCAGGAGGTGGCGTGGGGTGGACGGGTGGATTGAAATTTAGGCTGGCACGGTGG** - 3'
 Oligo 26-mer: 5'- **CGACCGTGCCAGCCTAAATTTCAATC** - 3'
 Oligo 35-mer: 5'- **CCAAGGCCACCCGTCCACCCGACGCCACCTCCTGC** - 3'

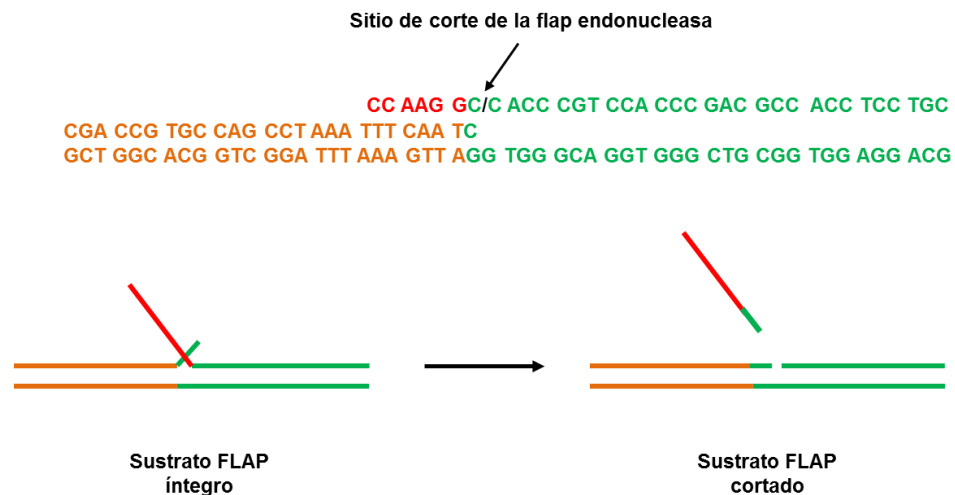


Figura 4. Estructura del sustrato FLAP. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados, con segmentos coloreados (café y verde) que indican las regiones complementarias entre ellos. En rojo se destaca la región 5' del oligonucleótido 35-mer que no hibrida con el oligonucleótido 54-mer, y que es cortada en su totalidad más un nucleótido que si hibrida. Abajo, se muestra un resumen esquemático de la estructura del sustrato FLAP y su procesamiento, usando el mismo código de colores para cada segmento.

Para estimar el pH óptimo de la actividad flap endonucleasa, se usaron las siguientes soluciones amortiguadoras: 50 mM acetato pH 5,0; 50 mM MES pH 5,5 y 6,0; 50 mM HEPES pH 7,0 y 8,0; 50 mM glicina pH 9,0 y 10,0.

Para los ensayos de corte y ligación, el oligonucleótido 26-mer fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P usando el mismo procedimiento antes mencionado, e hibridado con los oligonucleótidos 54-mer y 35-mer no marcados. De este sustrato de DNA se incubaron 0,5 pmoles con 18 μg de proteínas presentes en homogeneizados de epimastigotes, en 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM MgCl_2 , 10 mM ATP y 1 mM DTT por 1 h a 30°C, en presencia o ausencia de 10 U de DNA ligasa exógena (DNA ligasa T4, Promega), durante los últimos 20 min de incubación. La ligación del producto de DNA luego de ser cortado por la actividad flap endonucleasa es evidenciada por la unión del oligonucleótido 26-mer marcado con el fragmento remanente del oligonucleótido 35-mer, generando un oligonucleótido 54-mer marcado.

4.4 Construcción de los plásmidos pGEM-*tcfen1*, pQE-80L-*tcfen1*, pTREX-*his-tcfen1-gfp* y pTREX-*tcfen1-gfp-his*

A partir de DNA genómico de *T. cruzi* (cepa Dm28c), se amplificó la secuencia codificante de *tcfen1*, usando los partidores pQE-*tcfen*-fw y pQE-*tcfen*-rv (ver **Tabla I**) mediante PCR empleando la enzima Platinum Taq High Fidelity polymerase (Invitrogen). El programa de PCR usado consistió en un

paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguidos por 20 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 90 s, luego 20 ciclos de 95°C por 30 s y 72°C por 90 s, para terminar con una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplificadores obtenidos fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy (Promega), generándose el plásmido pGEM-*tcfen1* que contiene la secuencia nucleotídica completa de *tcfen1*, incluyendo los codones de inicio y término de la traducción. El plásmido obtenido fue purificado y se corroboró la presencia de la secuencia de *tcfen1* mediante PCR y secuenciación automática. pGEM-*tcfen1* fue usado como templado en posteriores reacciones de PCR realizadas durante la construcción de otros plásmidos y también como control positivo en reacciones de PCR.

Tabla I. Oligonucleótidos usados

Partidores		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción*
pQE- <i>tcfen</i> -fw	GGGGATCCATGGGGATCTTGGGTCTTTTCGA	<i>Bam</i> HI
pQE- <i>tcfen</i> -fw2	GTGGATCCGGGATCTTGGGTCTTTTCGAAG	<i>Bam</i> HI
pQE- <i>tcfen</i> -rv	GGGAAGCTTTTATTTCTTAACCACCTTTTGTGC	<i>Hind</i> III
pTREX-his- <i>tcfen</i> -fw	GGGAAGCTTGGGATCTTGGGTCTTTTCGAAG	<i>Hind</i> III
pTREX- <i>tcfen</i> -gfp-fw	GTCTAGAATGGGGATCTTGGGTCTTTTCG	<i>Xba</i> I
pTREX- <i>tcfen</i> -rv	GGGAAGCTTTTCTTAACCACCTTTTGTGCC	<i>Hind</i> III
Sustrato FLAP		
Nombre	Secuencia (5'-3')	
Oligo 54-mer	GCAGGAGGTGGCGTCGGGTGGACGGGTGGATTGAAATTTAGGCTGGCACGGTCCG	
Oligo 35-mer	CCAAGGCCACCCGTCCACCCGACGCCACCTCCTGC	
Oligo 26-mer	CGACCGTGCCAGCCTAAATTTCAATC	
(*) Los sitios de restricción se indican subrayados en los partidores		

Tomando pGEM-*tcfen1* como templado, se amplificó nuevamente la secuencia de *tcfen1* por PCR con los partidores pQE-*tcfen-fw2* y pQE-*tcfen-rv*. Mediante corte con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III seguida de posterior ligación, se clonó dicha secuencia en el plásmido pQE-80L (Qiagen), generando el plásmido pQE-80L-*tcfen1*, destinado a la producción de una proteína recombinante en bacterias de la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Estas proteínas poseen una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal (HIS-TcFEN1), que permite su purificación y detección.

Para generar el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp*, se amplificó la secuencia *tcfen1* con los partidores pTREX-*his-tcfen-fw* y pTREX-*tcfen-rv*, usando pGEM-*tcfen1* como templado y con el mismo programa de PCR. La presencia de sitios de restricción para la enzima *Hid*III en los partidores usados permitió el clonamiento mediante corte y posterior ligación de la secuencia *tcfen1* en el plásmido pTREX-*his-gfp*, para generar el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp*. El plásmido pTREX-*tcfen1-gfp-his*, por su parte, fue generado amplificando la secuencia de *tcfen1* con los partidores pTREX-*tcfen-gfp-fw* y pTREX-*tcfen-rv*, que presentan sitios de restricción para las enzimas *Xba*I y *Hind*III, respectivamente. Los amplificados obtenidos mediante el programa de PCR antes detallado fueron digeridos con las enzimas de restricción señaladas, produciendo extremos cohesivos orientados para su posterior ligación en el plásmido pTREX-*gfp-his*, generando el plásmido recombinante pTREX-*tcfen1-gfp-his*.

La construcción pTREX-*his-tcfen1-gfp* permitió la expresión en *T. cruzi* de una proteína recombinante de fusión con una extensión de 8 histidinas en el extremo N-terminal y con la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal (HIS-TcFEN1-GFP). Por otro lado, el plásmido pTREX-*tcfen1-gfp-his* permitió expresar una proteína recombinante de fusión TcFEN1-GFP-HIS, que posee el extremo N-terminal libre, mientras que en el extremo C-terminal está el dominio GFP y una extensión de 8 histidinas.

Los procesos de clonamiento de la secuencia de *tcfen1* y modificación de los plásmidos fueron realizados en bacterias DH5 α de *E. coli*, desde donde también fueron purificados para su almacenamiento o posterior uso. Todos los plásmidos usados (pGEM, pQE-80L y pTREX) otorgan resistencia a ampicilina, por lo que este antibiótico se usó para la selección de las bacterias transformantes. La correcta inserción de la secuencia de *tcfen1* en cada plásmido fue confirmada por PCR, digestión enzimática y secuenciamiento de DNA.

4.5 Transfección y sobreexpresión de HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS en epimastigotes de *T.cruzi*

Epimastigotes en fase exponencial de crecimiento fueron electroporados con los plásmidos pTREX-*his-tcfen1-gfp*, pTREX-*tcfen1-gfp-his* y con los correspondientes plásmidos control vacíos. Los parásitos fueron lavados en PBS estéril y resuspendidos en amortiguador de electroporación (120 mM KCl,

0,15 mM CaCl, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,6). Posteriormente 4x10⁷ parásitos fueron incubados por separado con 50-100 µg de cada plásmido. La electroporación fue llevada a cabo a 0,3 kV y 500 µF en dos pulsos separados por 30 s manteniendo los parásitos en hielo. Los epimastigotes transfectados fueron inmediatamente transferidos a medio LIT suplementado con 20% FBS e incubados a 28°C. Los plásmidos pTREX confieren resistencia al antibiótico G418, por lo que luego de 24 h de incubación se añadieron al cultivo 250 µg/ml de G418, concentración que fue elevada a 500 µg/ml a las 72 h para la selección de los parásitos transfectados. La eficiencia de la transfección fue monitoreada mediante microscopía de fluorescencia. Debido al bajo porcentaje de parásitos fluorescentes, los epimastigotes transfectados de los distintos cultivos fueron separados por FACS en un equipo FACSAria II (BD Biosciences), obteniendo cultivos con un 95% o más de parásitos fluorescentes, siendo estas poblaciones enriquecidas las que fueron usadas posteriormente.

La expresión de las proteínas de fusión generadas fue corroborada mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% y luego por Western blot usando anticuerpos primarios anti-GFP y/o anti-His y posterior detección por quimioluminiscencia usando un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research Laboratories), empleando el sistema comercial Supersignal West Pico kit (Thermo Scientific).

4.6 Purificación de las proteínas recombinantes HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS

Las proteínas recombinantes TcFEN1 generadas en bacterias BL21 de *E. coli* electroporadas con el plásmido pQE-80L-*tcfen1*, o en los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con los plásmidos pTREX-*his-tcfen1-gfp* o pTREX-*tcfen1-gfp-his* fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad mediante las extensiones de 6 y 8 histidinas que poseen las proteínas recombinantes, usando una resina HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) en condiciones nativas siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.7 Localización de las proteínas HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS en epimastigotes de *T. cruzi*

La localización de las proteínas recombinantes TcFEN1-GFP expresadas en epimastigotes de *T. cruzi* fue analizada mediante microscopía de fluorescencia, observando la señal fluorescente de los dominios GFP de las proteínas de fusión. Para esto, parásitos recombinantes fueron fijados en 70% metanol frío por 30 min, lavados en PBS y el DNA nuclear y del kinetoplasto fue teñido con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras fueron evaluadas usando filtros de 430±20 nm y 520±20 nm para la fluorescencia azul y verde, respectivamente (equipo Nikon Eclipse E400). Las fotografías fueron procesadas

computacionalmente para determinar la superposición de la señal del DAPI y del GFP mediante el programa Image J, versión 1.49m (Abramoff *et al.*, 2004).

4.8 Ensayos de proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados

La proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con los plásmidos pTREX antes mencionados y de aquellos no transfectados fue determinada tomando parásitos en fase exponencial de crecimiento de los diversos cultivos, siendo ajustada su concentración a 2×10^7 parásitos/ml en medio LIT suplementado con 10% FBS. Luego, alícuotas de cada cultivo fueron obtenidas diariamente, diluidas en PBS/10% formaldehído y los parásitos presentes fueron contados en cámaras de Neubauer.

4.9 Exposición de los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados a distintas concentraciones de H_2O_2 de forma aguda y sostenida

Cultivos de epimastigotes que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP, TcFEN1-GFP-HIS o los respectivos controles transfectados con los plásmidos vacíos, fueron incubados hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento y su concentración luego ajustada a $1,3 \times 10^7$ parásitos/ml. Estos parásitos fueron incubados con distintas concentraciones de H_2O_2 (0, 100, 250 y 500 μM) durante 30 min a 28°C en medio LIT, para luego ser centrifugados a 2000 xg por 2 min,

resuspendidos e incubados en medio fresco por 4 h. Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad o fueron observados mediante microscopía de fluorescencia, como se señaló anteriormente. Por otro lado, para generar condiciones oxidantes sostenidas, $1,3 \times 10^7$ parásitos fueron incubados por 2 o 4 h en presencia de 5 mM glucosa más 0, 25, 50 y 100 mU de glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Sigma) a 28°C en medio LIT. Estas condiciones generan de 45 a 65 μM H_2O_2 , según lo medido con el sistema comercial Amplex Red Hydrogen/Peroxide/Peroxidase (Invitrogen, Sepúlveda *et al.*, 2014). Luego de cumplido el tiempo de incubación, los parásitos fueron centrifugados a 2000 $\times g$ por 2 min y resuspendidos en medio fresco, para después usarlos en ensayos de viabilidad o ser observados mediante microscopía de fluorescencia.

4.10 Ensayos de viabilidad de los epimastigotes de *T. cruzi* transfectados frente a condiciones de estrés oxidativo agudo y sostenido

La viabilidad de los epimastigotes de *T. cruzi* que sobreexpresan TcFEN1-GFP-HIS expuestos a H_2O_2 fue evaluada tanto por el ensayo de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] (Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Sepúlveda *et al.*, 2014), como por el ensayo de Alamar Blue (Life Technologies, Rolón *et al.*, 2006) y ensayos de exclusión de yoduro de propidio (PI). Con este propósito, luego de la exposición a H_2O_2 se agregaron $1,3 \times 10^6$ parásitos (100 μl de epimastigotes resuspendidos en medio fresco) por pocillo en

placas de 96 pocillos y fueron incubados con 10 μ l de reactivo MTT a 5 mg/ml más 0,22 mg/ml de fenazina metosulfato, o 10 μ l de reactivo Alamar Blue. Luego de una incubación por 4 h a 28°C, el formazan insoluble generado en el ensayo de MTT fue disuelto en 100 μ l de 10% p/v SDS/0,01M HCl. Las placas fueron incubadas por otros 30 min a 37°C y se midió la absorbancia en lector de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific) usando un filtro a 570 nm. Las muestras incubadas con Alamar Blue durante 4 h fueron analizadas en un fluorímetro a 590 nm. Para los ensayos de exclusión de PI se tomaron muestras luego de la exposición a H₂O₂, las que fueron resuspendidas en PBS/glicerol 40%, se añadió PI (5 μ g/ml) y se analizó inmediatamente mediante microscopía de fluorescencia. Al menos 500 parásitos/muestra fueron analizados. La cuantificación de los parásitos totales y los teñidos con PI (no viables) se realizó mediante conteo manual usando el programa Image J, versión 1.49m (Abramoff *et al.*, 2004).

4.11 Bioinformática y modelamiento molecular

Los alineamientos y análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas fue realizada mediante el servidor online T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>). La secuencia aminoacídica deducida de TcFEN1 fue usada para realizar un modelamiento molecular usando el portal web Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), disponible en www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2. Para la visualización de los modelos obtenidos desde el servidor, se usó el programa VMD versión 1.9.1 (Humphrey *et al.*, 1996).

La predicción de señales de localización nuclear (NLS) en TcFEN1 fue realizada en el servidor PSORT II (Nakai & Horton, 1999; <https://psort.hgc.jp/>), a partir de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína.

4.12 Análisis estadístico

Los ensayos de proliferación y viabilidad fueron medidos en duplicado y cada experimento fue realizado en triplicado. Los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism (versión 5.0.3), siendo graficados como la media \pm SEM (error estándar de la media). Para los experimentos de proliferación, diferencias significativas en los datos fueron determinadas mediante ANOVA de dos vías, y posteriormente el test de Bonferroni. Los datos provenientes de los ensayos de viabilidad fueron comparados mediante el test *t* de Student de dos colas, con corrección de Welch.

5. RESULTADOS

5.1 *T. cruzi* presenta actividad flap endonucleasa

Para evaluar si en *T. cruzi* está presente una enzima con actividad flap endonucleasa, homogeneizados de las tres formas celulares del parásito (epimastigote, EPI; tripomastigote, TRIPO; amastigote, AMA) fueron incubados con el sustrato de DNA FLAP marcado en el extremo 5' del flap con ^{32}P , a 30°C por 10 y 30 min. Un fragmento 7-mer fue generado por todos los homogeneizados ensayados (**Figura 5A**), indicando la presencia de actividad flap endonucleasa en las distintas formas celulares de *T. cruzi*, tanto replicativas (epimastigote y amastigote) como no replicativa (tripomastigote).

Una importante característica de las flap endonucleasas es la de generar un producto que puede ser ligado directamente por una DNA ligasa luego de la escisión del flap 5' por la enzima (Liu *et al.*, 2004; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan & Bambara, 2013). Para verificar si la actividad enzimática antes vista presenta también esta característica, se incubó un homogeneizado de epimastigotes con el sustrato FLAP marcado esta vez con ^{32}P en el extremo 5' del oligonucleótido de 26-mer, en presencia de 10 mM ATP. Además se adicionó en otra mezcla 10 U de DNA ligasa exógena (DNA ligasa T4), para observar si ocurría la ligación de los productos generados por la actividad flap endonucleasa endógena, en caso de no detectarse actividad DNA ligasa endógena. Como se

observa en la **Figura 5B**, los homogeneizados de epimastigotes de *T. cruzi* fueron capaces de generar un producto reparado 54-mer, producto que fue más evidente en presencia de la DNA ligasa exógena (**Figura 5B**, carriles 2 y 3 respectivamente). Este resultado confirma, además, que los parásitos presentan una actividad reparadora del DNA.

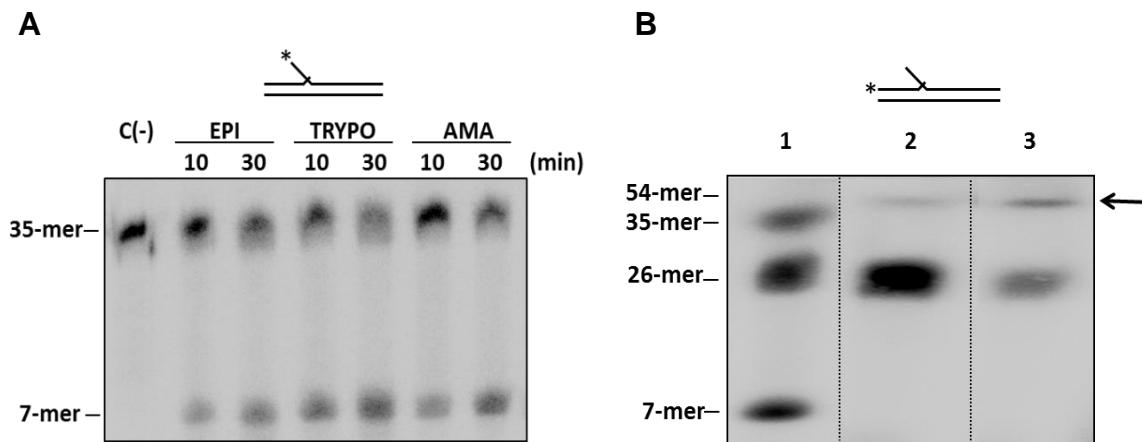


Figura 5. Actividad flap endonucleasa en homogeneizados de *T. cruzi*. **A)** Homogeneizados de epimastigotes (EPI), tripomastigotes (TRIPO) y amastigotes (AMA) (18 µg de cada uno) fueron incubados en 50 mM HEPES pH 8,0 a 30°C por 10 o 30 min en presencia del sustrato FLAP indicado (0,5 pmoles). Un fragmento marcado 7-mer fue generado, indicativo de la presencia de actividad flap endonucleasa en todas las formas celulares del parásito. C-, control negativo, sin homogeneizado, **B)** Reparación de los sustratos cortados por la actividad flap endonucleasa de *T. cruzi*. Homogeneizados de epimastigotes fueron incubados con el sustrato FLAP marcado en el oligonucleótido 26-mer con ^{32}P . La mezcla de reacción fue incubada durante 1 h a 30°C, en presencia de 10 mM ATP, en amortiguador 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM MgCl_2 . El oligonucleótido 35-mer que presenta el flap 5' fue cortado por la flap endonucleasa de *T. cruzi* y luego el fragmento remanente 28-mer fue ligado al oligonucleótido 26-mer marcado con ^{32}P , generando un oligonucleótido reparado 54-mer marcado en su extremo 5'. 1: Oligonucleótidos marcados de distintos tamaños; 2 y 3: generación del oligonucleótido de 54 mer (indicado por la flecha) en ausencia (2) o presencia (3) de 10 U de DNA ligasa exógena (DNA ligasa T4). Los esquemas de los sustratos usados se observan sobre cada experimento, indicando el lugar del sustrato marcado con ^{32}P (*).

Se analizó además el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad flap endonucleasa detectada en los homogeneizados de *T. cruzi*, bajo condiciones similares a las antes usadas. Como se observa en la **Figura 6A** y **6B**, la actividad flap endonucleasa fue mayor a pH 8,0 y entre 35°C - 40°C. Estos datos, sumados a los antes analizados, concuerdan con lo observado para flap endonucleasas de mamífero (Harrington & Lieber, 1994; Liu *et al.*, 2004).

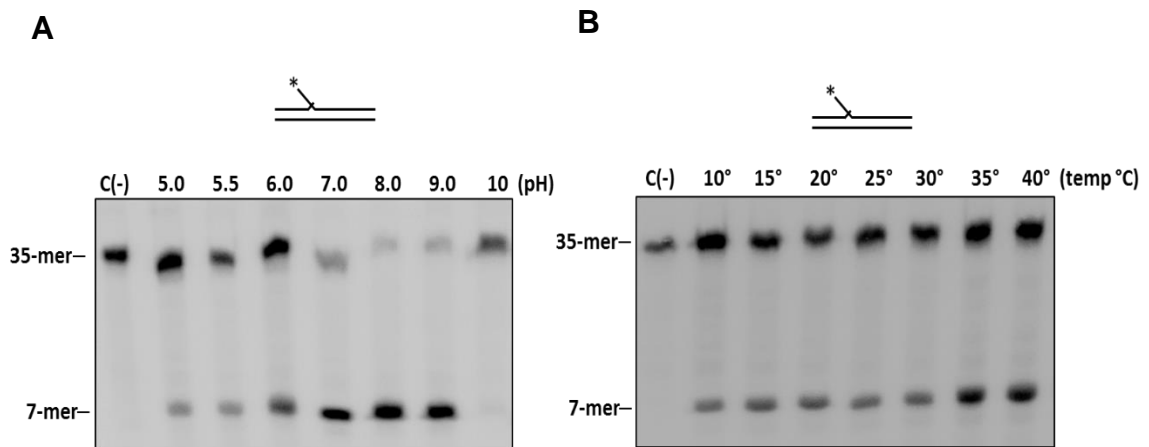


Figura 6. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad flap endonucleasa de *T. cruzi*. **A)** Efecto del pH del medio de reacción en la actividad flap endonucleasa. Homogeneizados de epimastigotes fueron incubados a distintos pH, por 30 min a 30°C en presencia del sustrato FLAP (0,5 pmoles). Un fragmento 7-mer, indicativo de actividad flap endonucleasa, se observó a los diferentes pHs empleados, generándose mayoritariamente a los valores de pH entre 8,0 y 9,0. C-: control negativo, sin homogeneizado de epimastigotes. **B)** Efecto de la temperatura sobre la actividad flap endonucleasa de *T. cruzi*. Homogeneizados del parásito fueron incubados a distintas temperaturas, en amortiguador 50 mM HEPES pH 8,0, 50 mM MgCl₂ por 30 min, en presencia del sustrato FLAP (0,5 pmoles). C-: control negativo, sin homogeneizados de epimastigotes. Tanto en **A)** como en **B)** se usaron 18 µg de proteínas presentes en los homogeneizados. Las distintas soluciones amortiguadoras usadas en **A)** se indican en Materiales y Métodos.

5.2 Un gen que codifica para una flap endonucleasa está presente en el genoma de *T. cruzi*

Una búsqueda en la base de datos Kinetoplastid Genomic Resource (TriTrypDB, Aslett *et al.*, 2010) permitió encontrar una secuencia de DNA en el genoma de *T. cruzi* (cepa CL Brener) que codificaría para una enzima flap endonucleasa (1182 pb, número de acceso GeneBank XM_809865.1, TriTrypDB gene ID TcCLB.511867.110) ortóloga a su correspondiente FEN1 en *Homo sapiens* (número de acceso GeneBank NM_004111). La secuencia aminoacídica deducida codifica una proteína de 393 residuos, de un tamaño predicho de 44,2 kDa y un punto isoeléctrico de 7,67. La **Figura 7** muestra un alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de la flap endonucleasa de *T. cruzi* (TcFEN1) con las secuencias aminoacídicas de flap endonucleasa de otros organismos: *Drosophila melanogaster* (número de acceso GeneBank 17647423), *Danio rerio* (número de acceso GeneBank 1036551479), *Homo sapiens* (número de acceso GeneBank 4758356), *Leishmania major* (número de acceso GeneBank 321438333) y *Sacharomyces cerevisiae* (número de acceso GeneBank 190409721). La identidad aminoacídica de TcFEN1 con FEN1 de *H. sapiens* fue de 48,60%, 48,85% con FEN1 de *D. melanogaster*, 50,76% con FEN1 de *D. rerio*, 46,23% con RAD27 (homólogo de FEN1) de *S. cerevisiae* y de un 72,47% con FEN1 putativo de *L. major*. Los residuos catalíticos claves presentes en todas las flap endonucleasas (Tsutakawa *et al.*, 2011) están completamente conservados en todas las secuencias aminoacídicas

analizadas, incluyendo TcFEN1 (**Figura 7A**). Esto nos indicó que TcFEN1 presenta características que se esperan encontrar en una flap endonucleasa canónica. Un cladograma fue construido considerando las secuencias aminoacídicas de todas las enzimas FEN1 presentadas (**Figura 7B**), mostrando una cercana relación evolutiva entre TcFEN1 y FEN1 putativa de *L. major*, ambos parásitos géneros de la familia Trypanosomatidae.

El gen que codifica TcFEN1 fue amplificado desde DNA genómico de *T. cruzi* (cepa Dm28c) mediante PCR y clonado en el plásmido pGEM-T Easy, el cual posteriormente fue purificado y corroborada la presencia de la secuencia *tcfen1* mediante PCR y secuenciación automática. La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia obtenida en las bases de datos para la cepa CL Brener. Se detectaron 12 nucleótidos diferentes entre ambas secuencias de *tcfen1*, que generan cambios en tres aminoácidos en la proteína TcFEN1 de *T. cruzi*: Lys147 (CL Brener) por Asn (Dm28c), Pro243 (CL Brener) por Ser (Dm28c) y Lys312 (CL Brener) por Glu (Dm28c). Ninguno de estos aminoácidos corresponde a residuos esenciales para la actividad de FEN1 (Tsukatakawa *et al.*, 2011, ver secuencia en anexos). Por otro lado, durante la realización de este trabajo fue publicada la secuencia genómica de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, a partir de la cual también se obtuvo la secuencia de *tcfen1*, la que correspondió a la secuencia encontrada por nosotros (Grisard *et al.*, 2014, gene ID TriTrypDB TCDM_06623).

siendo ambos géneros miembros de la misma familia. Es de notar que Lys también es capaz de coordinar de forma efectiva a iones K^+ . Los cuadrados (■) indican aminoácidos necesarios para unión del DNA en el sitio activo (Tsutakawa *et al.*, 2011). Todos estos aminoácidos se conservan, con la excepción de una Ala por Arg en la posición 108 de TcFEN1. Nuevamente, ambos trypanosomátidos muestran la misma modificación en la secuencia aminoacídica. **B)** Cladograma construido considerando las secuencias aminoacídicas de las enzimas FEN1 antes analizadas, mediante el programa PHY-FI (Fredslund, 2006), disponible en <http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/phyfi/go>.

La secuencia aminoacídica deducida de TcFEN1 de la cepa Dm28c fue usada para realizar un modelamiento molecular usando el programa Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) disponible en la página web www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2. Al comparar los resultados obtenidos con la estructura de FEN1 humana (hFEN1), se observa que la proteína parasitaria predicha muestra una alta similitud estructural con su contraparte humana, como se esperaría de la identidad de secuencia observada antes en el alineamiento (**Figura 8**). Sin embargo, se observó una clara diferencia en la zona C-terminal de las proteínas, donde TcFEN1 presenta una región C-terminal más larga que la observada en hFEN1 (**Figura 8**, círculo rojo). Otra diferencia encontrada fue en el NLS: mientras que para hFEN1 se ha descrito un NLS de tipo “bipartito” que corresponde a los aminoácidos ³⁵⁴KRKEPEPKGSTKKKAKT³⁷⁰ (De Barros *et al.*, 2012), al ingresar la secuencia aminoacídica de TcFEN1 en el servidor PSORT II (Nakai & Horton, 1999; <https://psort.hgc.jp/>) se determinó que posee un NLS del tipo “pat4”, correspondiente a los residuos ²⁰⁴KKRP²⁰⁷, similar al que se encuentra en el antígeno T del virus SV40 (Hicks & Raikhel, 1995). De forma

similar, se observa que FEN1 de *L. major* comparte esta secuencia NLS con TcFEN1 (**Figura 7A**).

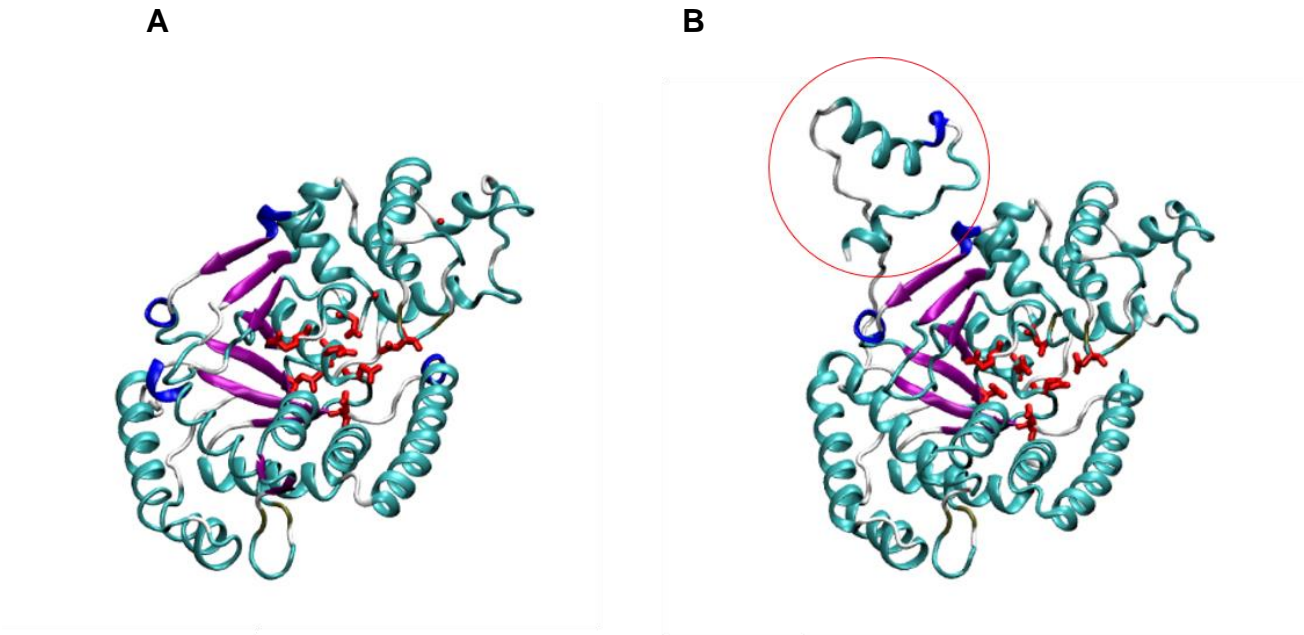


Figura 8. Modelamiento molecular de TcFEN1. **A)** Modelamiento de FEN1 humana (hFEN1), obtenida desde datos cristalográficos; **B)** Modelamiento de TcFEN1, realizado *in silico* a partir de la secuencia aminoacídica deducida de TcFEN1. En rojo, se destacan en ambas proteínas aminoácidos esenciales para la catálisis enzimática. El círculo rojo señala el extremo C-terminal de TcFEN1, de mayor longitud que el de hFEN1.

5.3 Expresión y actividad de las proteínas HIS-TcFEN1, HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS

Para confirmar que las secuencias encontradas realmente codifican una enzima flap endonucleasa, se decidió expresar TcFEN1 como proteína recombinante para poder purificarla y comprobar su actividad enzimática. Para esto, se expresó TcFEN1 en bacterias de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-80L-*tcfen1*. Este plásmido permite la

expresión de proteínas recombinantes con una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal, generando la proteína HIS-TcFEN1. En la **Figura 9**, se muestra la inducción de la expresión de HIS-TcFEN1 usando IPTG 1 mM, a distintos tiempos, observándose la expresión por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (**Figura 9A**) y Western blot usando un anticuerpo primario anti-HIS (**Figura 9B**). Si bien se logró un buen nivel de expresión, no se pudo obtener la proteína en condiciones nativas, ya que se encontró formando cuerpos de inclusión. Diversos ensayos variando distintas condiciones, como temperatura de incubación, tiempo, concentración de IPTG, adición de betaína al cultivo e intentos de renaturación luego de purificación en condiciones desnaturantes (no mostrados) no lograron solucionar este problema, por lo que no se pudo obtener desde esta fuente la proteína HIS-TcFEN1 activa para poder realizar ensayos funcionales.

Debido a lo anterior, para poder evaluar la actividad enzimática de las proteínas recombinantes purificadas TcFEN1, epimastigotes de *T. cruzi* fueron transfectados con los plásmidos pTREX-*his-tcfen1-gfp* o pTREX-*tcfen1-gfp-his* para generar las proteínas recombinantes HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS, respectivamente. Estas diferentes versiones de la proteína recombinante TcFEN1-GFP fueron diseñadas debido a la posibilidad de que una extensión en la zona N-terminal de la proteína pudiese ser dañina para la actividad o correcto plegamiento de la enzima flap endonucleasa, como se ha

descrito para otras enzimas FEN1 recombinantes (Finger *et al.*, 2012), lo que podría explicar los resultados obtenidos en *E. coli*.

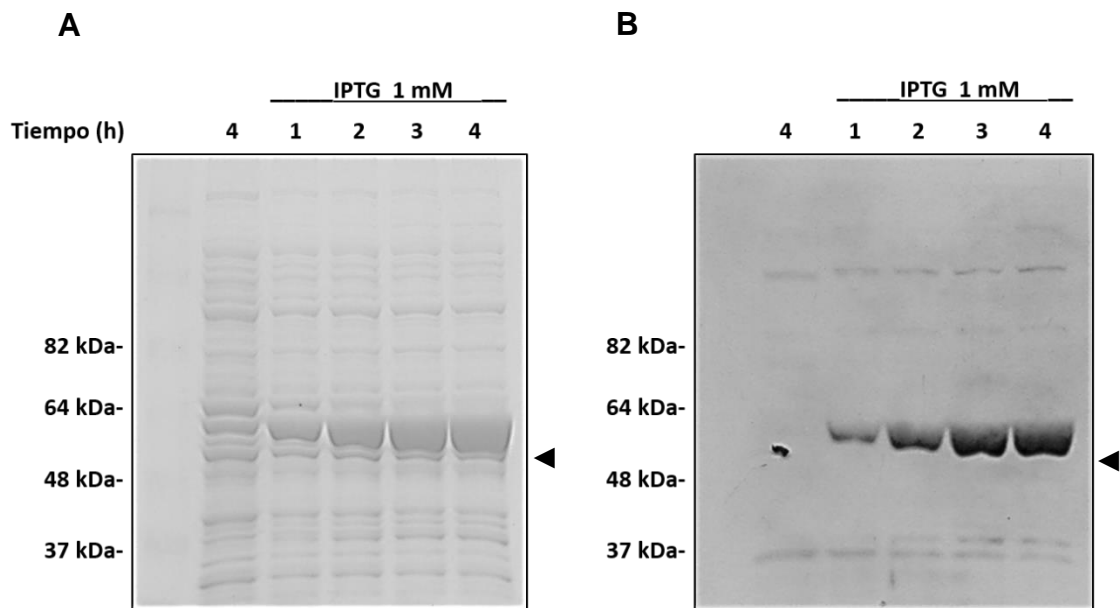


Figura 9. Expresión de HIS-TcFEN1 en *E. coli*. Expresión de HIS-TcFEN1 en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, mediante inducción con IPTG a distintos tiempos de incubación a 37°C. **A)** SDS-PAGE (poliacrilamida al 8%) teñido con azul de Coomassie. **B)** Western blot revelado por quimioluminiscencia, usando un anticuerpo primario anti-HIS y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano. La proteína HIS-TcFEN1 se indica mediante una cabeza de flecha.

La proteína recombinante HIS-TcFEN1-GFP fue expresada en epimastigotes de *T. cruzi*. Cuando es detectada mediante Western blot usando un anticuerpo anti-GFP, se observa como una doble banda (**Figura 10A**, línea 2, flecha). Los epimastigotes transfectados con el plásmido control pTREX-*his-gfp* no expresaron la proteína (**Figura 10A**, línea 1, cabeza de flecha). Cuando se purificó posteriormente la proteína HIS-TcFEN1-GFP bajo condiciones nativas, solo se observó la banda superior (**Figura 10B**, flecha).

Esta proteína purificada presentó actividad flap endonucleasa, evidenciada por la aparición de un fragmento 7-mer cuando fue incubada con el sustrato FLAP antes usado (**Figura 10C**, línea 3, flecha). La línea 1 muestra el sustrato no cortado, mientras que en la línea 2 se observa la actividad de un lisado de tripomastigotes como control (flecha). De forma similar, la proteína recombinante TcFEN1-GFP-HIS purificada presentó un patrón de purificación muy parecido (no mostrado).

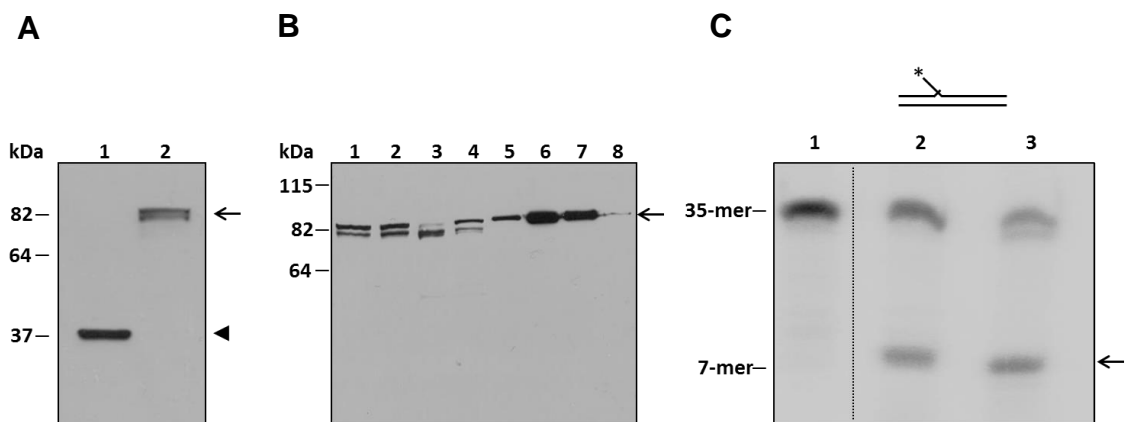


Figura 10. Expresión, purificación y actividad flap endonucleasa de la proteína recombinante HIS-TcFEN1-GFP. **A)** La proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP fue detectada mediante Western blot usando un anticuerpo primario anti-GFP desde homogeneizados de epimastigotes transfectados con el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp*. Línea 1, proteína GFP control (cabeza de flecha). Línea 2, la proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP (flecha). **B)** La proteína HIS-TcFEN1-GFP fue purificada bajo condiciones nativas en una columna de Ni-agarosa y detectada por Western blot con un anticuerpo anti-GFP. Línea 1: homogeneizado de epimastigotes transfectados que expresan HIS-TcFEN1-GFP; 2: sobrenadante del homogeneizado luego de centrifugar a 20,000 xg; 3: Proteínas no retenidas por la columna; 4 y 5: Lavados realizados a la columna de purificación; 6, 7 y 8: eluidos de la columna. **(C)** El sustrato FLAP marcado con ^{32}P en la región no complementaria (flap) fue incubado en ausencia de enzima purificada (control negativo, línea 1), con un homogeneizado de tripomastigotes de *T. cruzi* (control positivo, línea 2) o con la enzima HIS-TcFEN1-GFP purificada en condiciones nativas (línea 3). La presencia de un fragmento 7-mer marcado indica la presencia de actividad flap endonucleasa en las muestras analizadas (flecha).

Tanto HIS-TcFEN1-GFP como TcFEN1-GFP-HIS presentaron actividad flap endonucleasa, mostrando que la localización de la extensión de 8 histidinas no influyó en la actividad de la enzima (**Figura 11**). Ambas proteínas TcFEN1-GFP presentaron actividad flap endonucleasa en magnitudes similares (15% aprox. de sustrato procesado, bajo las condiciones usadas), aunque debieron usarse recién purificadas o almacenadas a -20° C con 50% glicerol, ya que de otra manera se pierde la actividad flap endonucleasa (**Figura 11**).

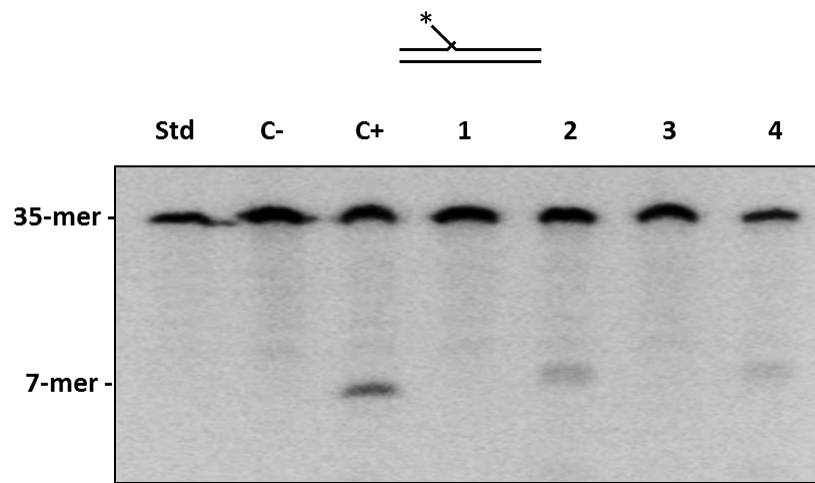


Figura 11. HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS poseen actividad flap endonucleasa, la que es sensible al congelamiento. Std: oligonucleótido 35-mer; C-: control negativo, sin homogeneizado de *T. cruzi*; C+: Control positivo, homogeneizado de epimastigotes de *T. cruzi* (30 ng de proteínas); 1 y 2: HIS-TcFEN1-GFP, 30 ng; 3 y 4: TcFEN1-GFP-HIS, 30 ng. Las proteínas recombinantes fueron almacenadas a -20°C (overnight) luego de su purificación. En el caso de las muestras 2 y 4, éstas fueron almacenadas a -20°C en presencia de 50% glicerol. Se incubó durante 1 hora con 0,5 pmoles del sustrato FLAP, en amortiguador 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM MgCl₂. Los porcentajes de sustrato procesado, estimados mediante densitometría, fueron de 28% para C+, 15% en la muestra 2 y 14% en la muestra 4.

La actividad flap endonucleasa de las enzimas TcFEN1-GFP purificadas desde epimastigotes de *T. cruzi* también fue afectada por la presencia de agentes

reductores, como DTT. Así, la adición de este compuesto en una concentración 2 mM final ayudo a preservar por más tiempo la actividad flap endonucleasa, por lo que se adicionó DTT a la enzima purificada antes de su almacenaje y también en los ensayos de actividad (no mostrado). En la **Figura 12** se observa la actividad flap endonucleasa de TcFEN1-GFP-HIS a distintas concentraciones de la enzima purificada y almacenada bajo las condiciones antes detalladas.

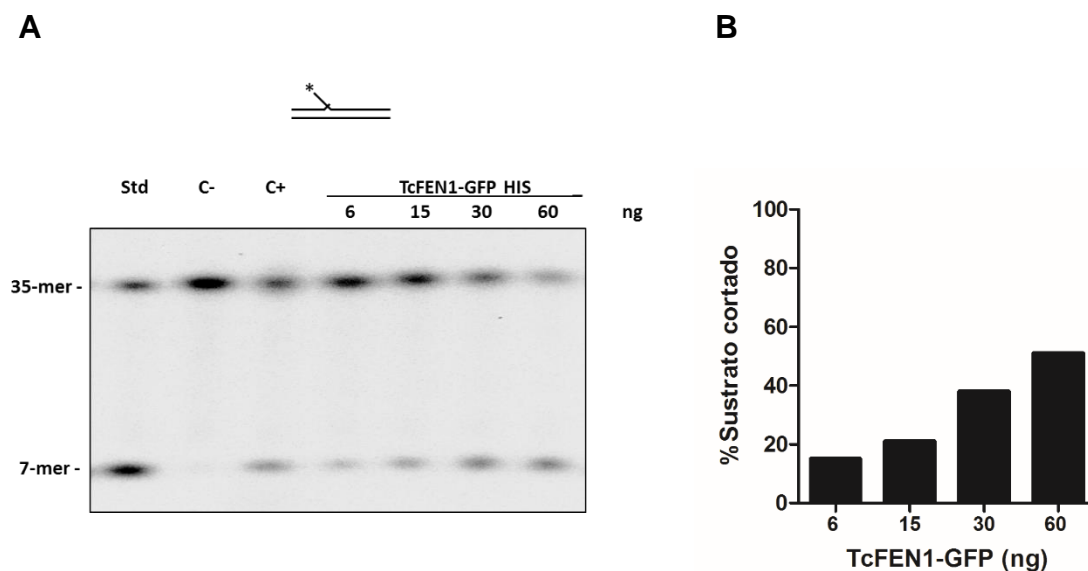


Figura 12. Actividad enzimática de TcFEN1-GFP-HIS a distintas concentraciones de la enzima. A) Procesamiento del sustrato FLAP por TcFEN1-GFP-HIS a distintas concentraciones de la enzima. Std: oligonucleótido 35-mer y 7-mer; C-: control negativo, sin homogeneizado de *T. cruzi*; C+: Control positivo, homogeneizado de epimastigotes de *T. cruzi* (30 ng de proteínas). Se incubó durante 1 hora con 0,25 pmoles del sustrato FLAP, en amortiguador 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT. **B)** Gráfico del porcentaje de sustrato procesado respecto a la cantidad de enzima usada. Los porcentajes de sustrato procesado, estimados mediante densitometría, fueron de 28% para C+, 15%, 21%, 38% y 51% para TcFEN1-GFP-HIS usando 6, 15, 30 y 60 ng, respectivamente.

5.4. La proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP expresada en *T. cruzi* se localiza en el núcleo del parásito

Para determinar la localización subcelular de TcFEN1 en *T. cruzi*, se analizó la distribución de la proteína HIS-TcFEN1-GFP en los parásitos transfectados con el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp* mediante microscopía de fluorescencia. La **Figura 13A** muestra un epimastigote que expresa la proteína HIS-TcFEN1-GFP (contraste de fase). La tinción del DNA del parásito con DAPI muestra que la señal del DNA nuclear del parásito (**Figura 13B**, flecha) co-localiza con la señal fluorescente de la proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP (**Figura 13C**). La sobreposición de las señales del DAPI y de HIS-TcFEN1-GFP muestra la ausencia de la enzima en el kinetoplasto de *T. cruzi* (**Figura 13D**). TcFEN1 se encuentra en agregados en el nucleoplasma. Investigaciones previas usando el vector control pTREX-*gfp* mostraron que la proteína fluorescente verde (GFP) expresada en los parásitos se distribuía por todo el citoplasma (Sepúlveda *et al.*, 2014; Ormeño *et al.*, 2016).

Para determinar si la localización subcelular de HIS-TcFEN1-GFP era modificada frente a daño al DNA, los epimastigotes que expresan la proteína recombinante fueron expuestos a H₂O₂ (200 y 500 µM) por 30 min, luego mantenidos en medio fresco por 2 h y después fueron fijados y teñidos con DAPI. Como se observa en la **Figura 14**, no se observaron cambios en la localización celular de HIS-TcFEN1-GFP, manteniéndose la señal fluorescente de la proteína

solo en el núcleo. Los mismos resultados se observaron con los parásitos expuestos a condiciones de estrés oxidativo crónico usando 25 y 100 mU de glucosa oxidasa por 4 h (**Figura 15**).

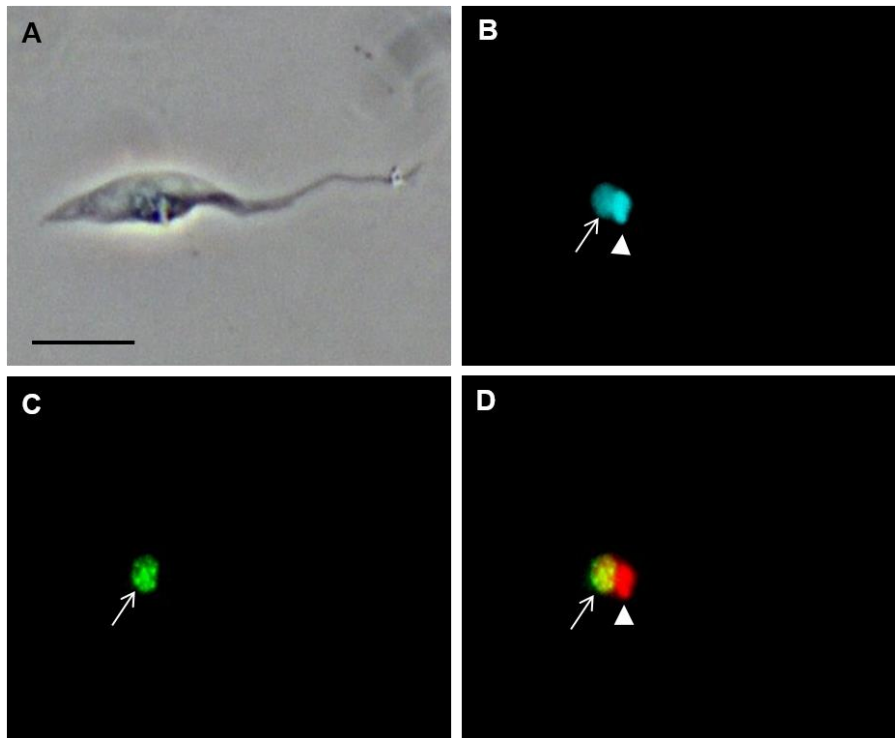


Figura 13. La proteína de fusión HIS-TcFEN1-GFP se localiza en el núcleo de epimastigotes de *T. cruzi*. Epimastigotes transfectados con el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp* fueron fijados en 70% metanol frío por 30 m. **A)** Contraste de fase; **B)** Tinción con DAPI del DNA; **C)** Microscopía de fluorescencia directa de HIS-TcFEN1-GFP; **D)** **B)** y **C)** combinadas. Para la imagen combinada, la señal de DAPI fue pseudo coloreada de rojo. La flecha indica el núcleo del parásito, la cabeza de flecha indica el kinetoplasto. Barra: 10 μ m.

Los resultados obtenidos también fueron observados en epimastigotes que expresan TcFEN1-GFP-HIS (no mostrado), confirmando la localización nuclear de TcFEN1.

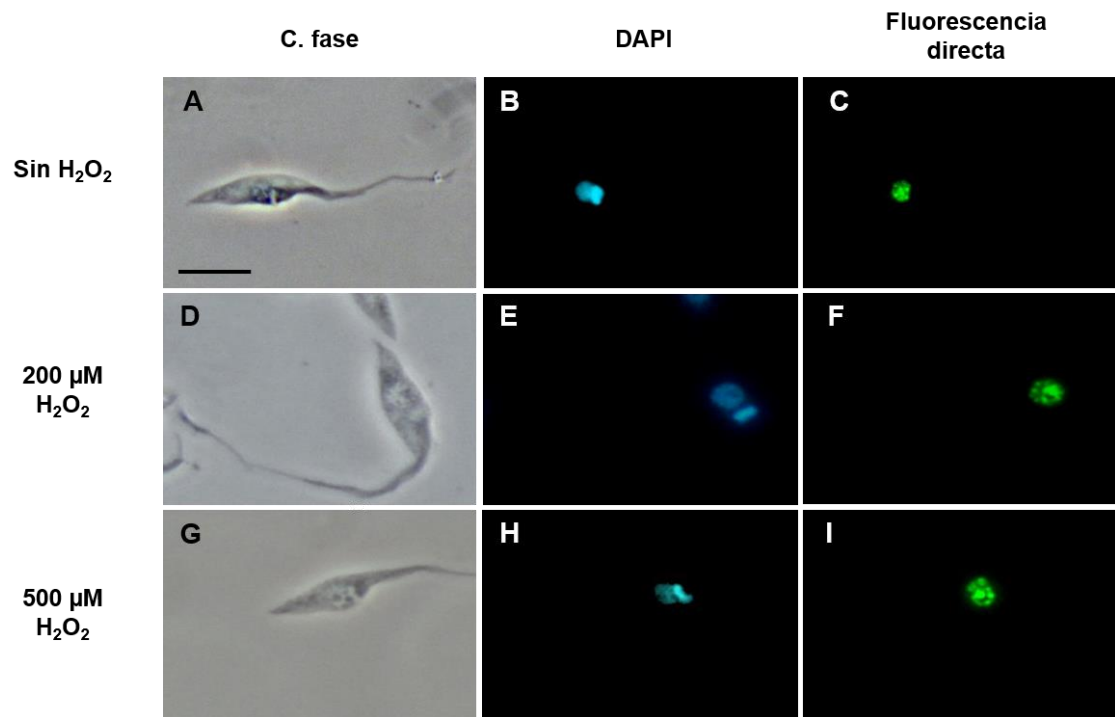


Figura 14. La localización subcelular de HIS-TcFEN1-GFP no se altera ante la exposición a H₂O₂. Epimastigotes transfectados con el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp* fueron expuestos a 200 y 500 μM H₂O₂ por 30 m, luego mantenidos en medio fresco por 2 h, para finalmente ser fijados en 70% metanol frío por 30 m y teñidos con DAPI. **A), D) y G):** Contraste de fase; **B), E) y H):** Tinción con DAPI del DNA; **C), F) e I):** Microscopía de fluorescencia directa de HIS-TcFEN1-GFP. Barra: 10 μm.

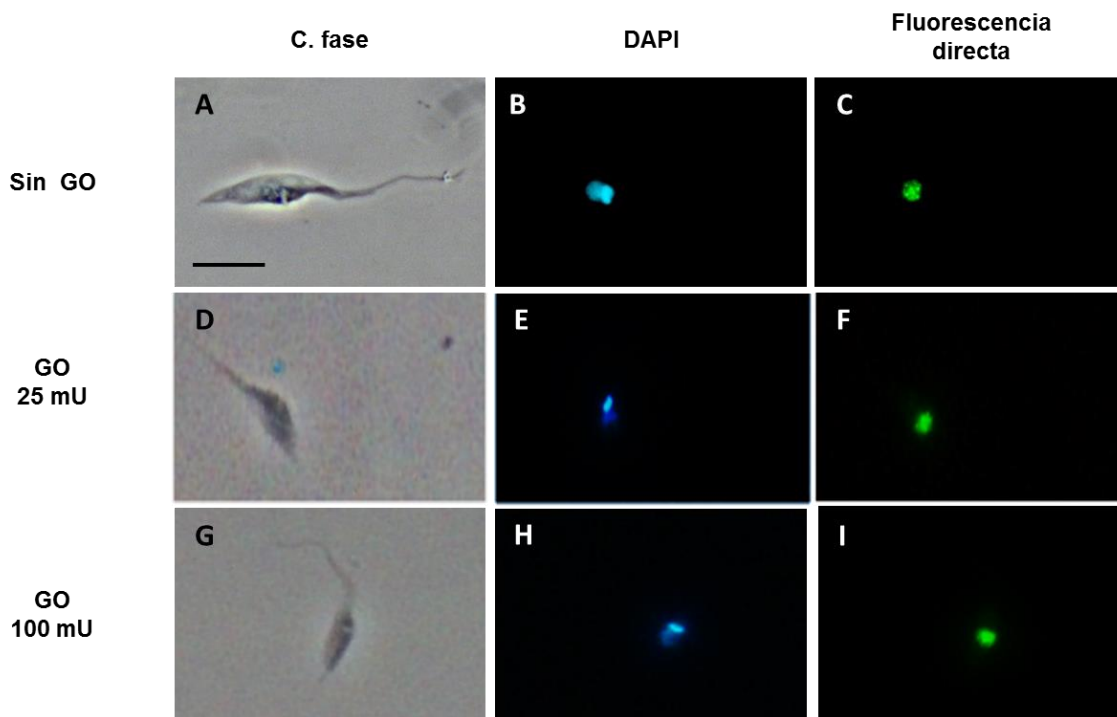


Figura 15. La exposición sostenida a H₂O₂ no altera la localización subcelular de HIS-TcFEN1-GFP. Epimastigotes transfectados con el plásmido pTREX-*his-tcfen1-gfp* fueron expuestos a 25 y 100 mU de GO por 4 h, y luego fijados en 70% metanol frío por 30 m y teñidos con DAPI. **A), D) y G)**: Contraste de fase; **B), E) y H)**: Tinción con DAPI del DNA; **C), F) e I)**: Microscopía de fluorescencia directa de HIS-TcFEN1-GFP. Barra: 10 μ m.

5.5 La sobreexpresión de TcFEN1 aumenta la proliferación del parásito

Epimastigotes transfectados que sobreexpresan las proteínas recombinantes HIS-TcFEN1-GFP o TcFEN1-GFP-HIS fueron enriquecidos por FACS para obtener cultivos con más de un 90% de los parásitos expresando las proteínas recombinantes y se analizó el efecto de la expresión de estas proteínas en la proliferación del parásito (**Figura 16**). La sobreexpresión de las proteínas HIS-TcFEN1-GFP (**Figura 16A**, triángulos) y TcFEN1-GFP-HIS (**Figura 16B**,

triángulos) produjo un significativo incremento en la proliferación celular, comparado con lo observado en epimastigotes no transfectados (**Figura 16A** y **Figura 16B**, diamantes) o parásitos transfectados con los vectores vacíos, que expresan GFP (**Figura 16A** y **Figura 16B**, cuadrados).

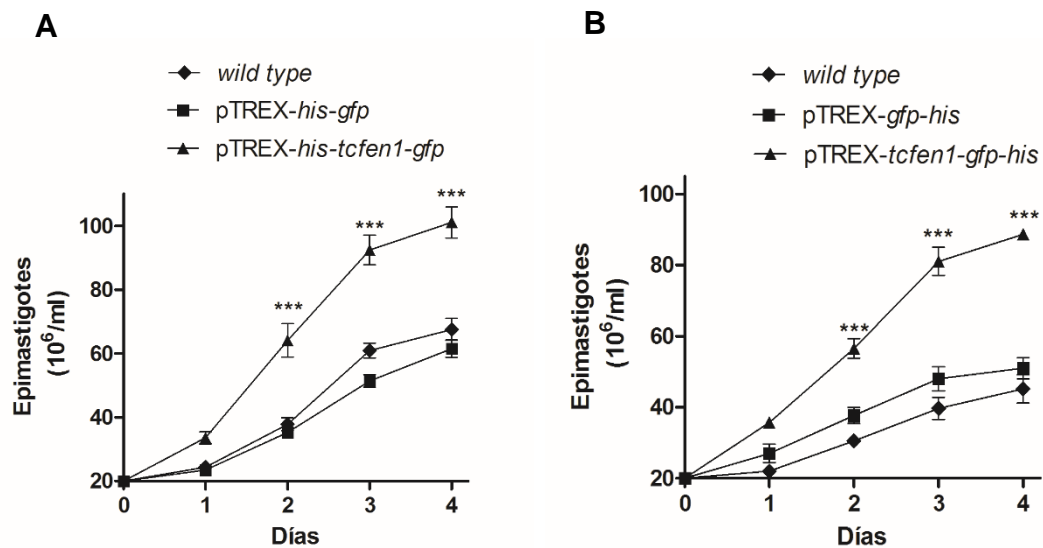


Figura 16. La sobreexpresión de HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS aumenta la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. **A)** Epimastigotes transfectados con el plásmido pTREX-his-tcfen1-gfp. **B)** Epimastigotes transfectados con el plásmido pTREX-tcfen1-gfp-his. Los parásitos fueron mantenidos en fase de crecimiento exponencial. La concentración inicial de células fue de 2×10^7 parásitos por ml y el número de células fue determinado mediante conteo en cámara de Neubauer cada 24 h. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes, resultados analizados mediante ANOVA de dos vías y posteriormente por el test de Bonferroni. Valor de p: *** = $p < 0.001$.

5.6. La sobreexpresión de TcFEN1 no altera la sobrevivencia de los parásitos expuestos a estrés oxidativo agudo, pero si bajo estrés oxidativo sostenido

Dada las funciones de FEN1 en la reparación del DNA, se analizó el efecto de la sobreexpresión de TcFEN1 en la sobrevivencia de *T. cruzi* al ser expuesto a un

agente oxidante, H₂O₂. Para esto, cultivos de epimastigotes que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento y luego expuestos a distintas concentraciones de H₂O₂ durante 30 min, para después analizar la viabilidad mediante ensayos de MTT, Alamar Blue y PI (**Figura 17**). En general, se observa que la exposición a variadas concentraciones de H₂O₂ disminuye la viabilidad de los parásitos de forma concentración dependiente, sin que se observe una diferencia clara en los distintos ensayos usados ni entre los cultivos que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP de aquellos que solo expresan GFP (**Figura 17**). Observando los distintos experimentos en conjunto y la tendencia en ellos, la diferencia encontrada entre los cultivos en el ensayo de PI a 250 µM H₂O₂ pierde relevancia al no sustentarse en los otros ensayos. Descontando ese punto, no se observan diferencias significativas entre los distintos ensayos.

Como se ha descrito que *T. cruzi* puede estar sometido a condiciones de estrés oxidativo en sus diferentes formas celulares y durante períodos extensos (Cardoni *et al.*, 1997; Graca-Souza *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2011) como es el caso del estallido respiratorio en los macrófagos (Piacenza *et al.*, 2009), se simuló la condición de estrés oxidativo sostenido mediante un modelo de producción continua de H₂O₂ usando el sistema glucosa/glucosa oxidasa (Sepúlveda *et al.*, 2014; Ormeño *et al.*, 2016) por 2 h (**Figura 18A**) y 4 h (**Figura 18B**) con los mismos cultivos usados previamente. La viabilidad de los parásitos fue medida posteriormente mediante ensayos de MTT.

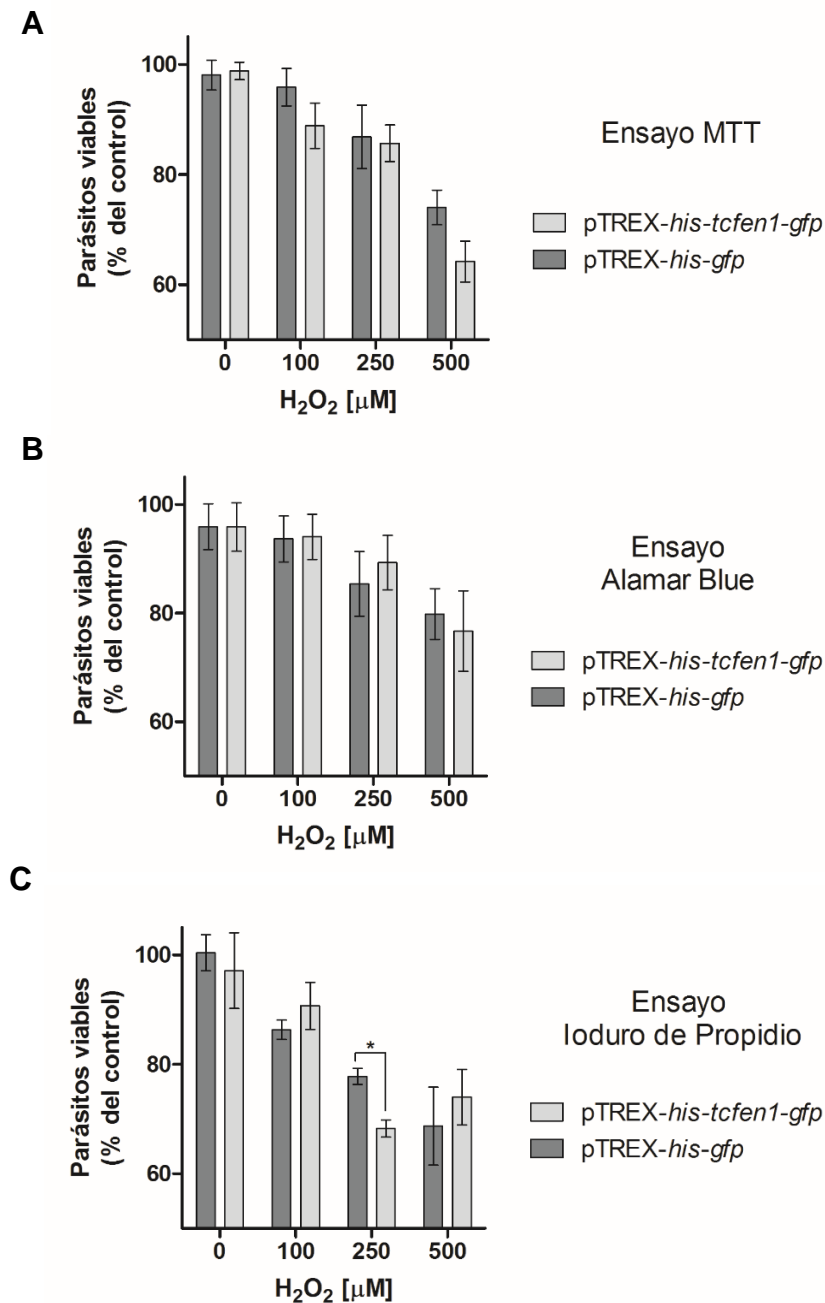


Figura 17. Viabilidad de epimastigotes que sobreexpresan TcFEN1 sometidos a estrés oxidativo agudo. Epimastigotes que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP y parásitos transfectados con el vector vacío fueron tratados por 30 m con distintas concentraciones de H₂O₂ (0, 100, 250, y 500 μM), para luego ser centrifugados y puestos en medio fresco. La viabilidad fue determinada mediante ensayo de MTT **A**), Alamar Blue **B**) y PI **C**). Los resultados corresponden a la media ± SEM de tres experimentos independientes, datos analizados mediante test *t* de Student de dos colas, con corrección de Welch. Valor de *p*: * = *p*<0.05.

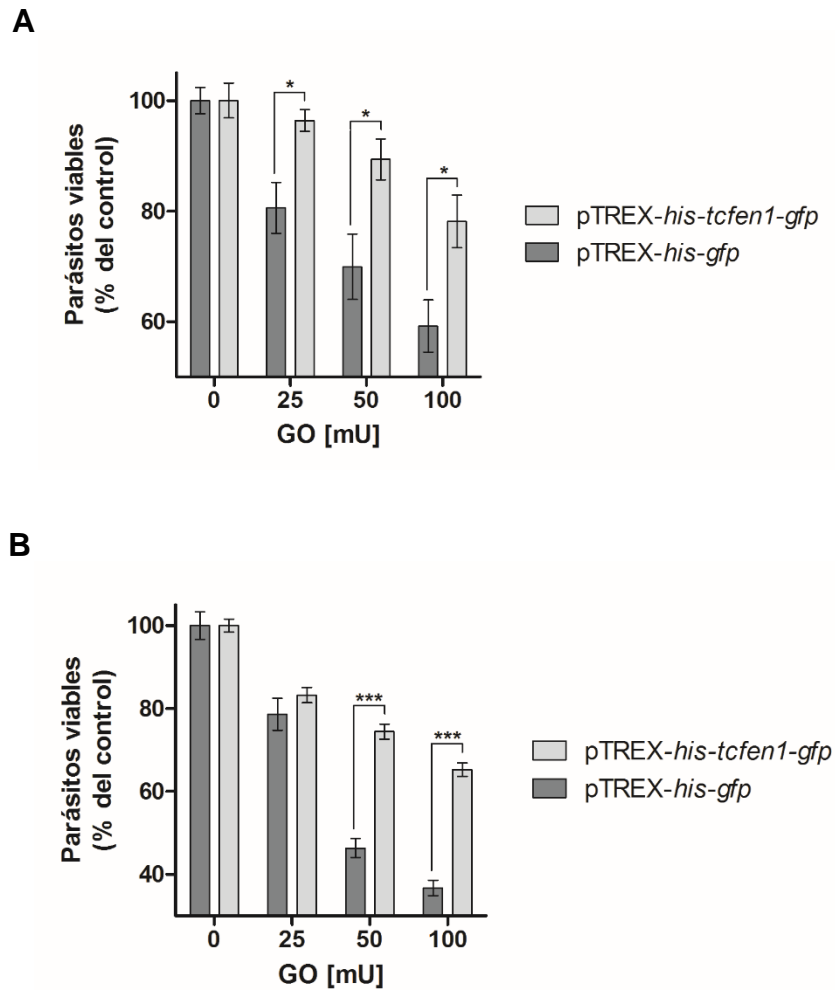


Figura 18. Viabilidad de epimastigotes que sobreexpresan TcFEN1 sometidos a estrés oxidativo sostenido por 2 y 4 h. Epimastigotes que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP y parásitos transfectados con el vector vacío fueron tratados por 2 (**A**) o 4 h (**B**) con un sistema enzimático glucosa/glucosa oxidasa (GO), que produce concentraciones sostenidas de H₂O₂. Se usaron distintas concentraciones de GO (0, 25, 50 y 100 mU). La viabilidad fue determinada mediante ensayo de MTT. Los resultados corresponden a la media ± SEM de tres experimentos independientes, datos analizados mediante test *t* de Student de dos colas, con corrección de Welch. Valores de *p*: * = *p*<0.001; *** = *p*<0.05.

A diferencia de lo observado en la exposición a H₂O₂ aguda, los ensayos de exposición sostenida de 2 y 4 h muestran que existen diferencias significativas entre la viabilidad de los cultivos que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP de

aquellos transfectados con el vector vacío y que expresan GFP. A partir de estos experimentos, se determinó que bajo las condiciones y ensayos usados, la sobreexpresión de la enzima TcFEN1 no alteró la sobrevivencia de los parásitos expuestos a estrés oxidativo agudo, pero sí lo hizo frente a condiciones de estrés oxidativo sostenido, observándose un aumento en la viabilidad de los parásitos que sobreexpresan HIS-TcFEN1-GFP, efecto principalmente observado al usarse concentraciones de GO de 50 y 100 mU.

6. DISCUSIÓN

La proliferación de *T. cruzi* y su sobrevivencia frente a estrés oxidativo mediante la reparación del daño al DNA son procesos esenciales para la persistencia del parásito en sus hospederos, tanto mamíferos como insectos triatomíneos. Considerando que la actividad flap endonucleasa juega un rol clave tanto en la replicación como en la reparación del DNA, es de crucial importancia estudiar la presencia y actividad de una enzima flap endonucleasa en el parásito.

Se ha propuesto que FEN1 es una enzima ancestral, que ha sido conservada a través de la evolución por sus funciones esenciales para preservar la integridad y viabilidad del genoma celular. Esta actividad enzimática está presente en procariontes como un dominio asociado a la DNA polimerasa I, mientras que en arqueas y eucariontes corresponde a una enzima independiente (Kao *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2007, 2011; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan & Bambara, 2013). La importancia de FEN1 en el metabolismo del DNA de otros eucariontes, la detección de enzimas de la vía BER de reparación del DNA en *T. cruzi* (Cabrera *et al.*, 2011; Furtado *et al.*, 2012; Sepúlveda *et al.*, 2014; Machado-Silva *et al.*, 2016; Ormeño *et al.*, 2016) y la caracterización de flap endonucleasas en otros protozoos como *P. falciparum* (Casta *et al.*, 2008) nos sugirió fuertemente la presencia de una enzima flap endonucleasa en *T. cruzi*.

Las enzimas FEN1 presentan un alto grado de homología de secuencia entre las distintas especies estudiadas, particularmente en la región N-terminal y central de la proteína, donde se encuentran los principales dominios catalíticos y de unión al sustrato (Tomlinson *et al.*, 2010; Balakrishnan & Bambara, 2013). La región C-terminal, aunque también participa en la unión a sustrato (Stucki *et al.*, 2001), presenta una mayor diversidad de secuencia. Se ha descrito la presencia de modificaciones post-traduccionales en esta región, como acetilaciones y fosforilaciones que afectan la actividad de la enzima (Hasan *et al.*, 2001; Friedrich-Heineken *et al.*, 2003; Henneke *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2011). Esta región es también de importancia como dominio de unión para otras proteínas que pueden regular la actividad de FEN1, como es el caso de PCNA (Chapados *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011). PCNA de *Trypanosoma* muestra una conservación en su secuencia aminoacídica cercana o superior al 50%, comparada con las secuencia de PCNA de eucariontes más recientes (resultados sin publicar), una situación similar a la que encontramos para TcFEN1. Estas dos proteínas están evolutivamente relacionadas y su acción coordinada es central para la mantención de los genomas eucariontes. Por esto no es sorprendente que ambas proteínas estén particularmente conservadas en *T. cruzi*. Otras proteínas relacionadas con la replicación del DNA, como Orc, o involucradas en la reparación del DNA, como TcAPE1, TcAPE2 y TcNth1, presentan un menor grado de conservación. Esto probablemente se debe a que estas enzimas no

juegan un rol en la coordinación de la replicación y reparación del DNA, como PCNA y TcFEN1.

Es destacable la elongada región C-terminal de TcFEN1 comparada con hFEN1, una característica compartida por la flap endonucleasa de *L. major* (**Figura 7A**) y en un grado más extremo por PpFEN-1 de *P. falciparum* (Casta *et al.*, 2008). Dado que esta región presenta un mayor grado de variabilidad en su secuencia aminoacídica que otras regiones de las proteínas FEN1 y participa en la unión al sustrato y la regulación de la actividad enzimática de FEN1 (Stucki *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2011), esto puede representar diferencias en la funcionalidad y regulación de estas enzimas respecto a sus homólogos de mamíferos, un reflejo quizás de una bifurcación ancestral en el grupo de enzimas FEN1. Las diferencias entre la señal NLS encontrada en TcFEN1 respecto a lo observado en hFEN1 podría responder a este mismo fenómeno evolutivo. Más análisis bioquímicos y filogenéticos se necesitan para explicar de mejor forma las diferencias observadas.

La compartimentalización de los procesos celulares es una característica particular de los eucariontes. Considerando la importancia de FEN1 en la replicación y reparación del DNA, entre otros procesos, era esperable encontrar TcFEN1 en el núcleo celular. En efecto, cuando se expresó las proteínas de fusión HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS en epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento, las enzimas fueron encontradas como

agrupaciones en el núcleo del parásito, mientras que el GFP se distribuyó de manera homogénea en el citoplasma. Trabajos previos han mostrado que proteínas relacionadas con la replicación del DNA, como TcOrc1/Cdc6 y TcPCNA, están localizadas en la periferia del núcleo del parásito cuando las células están en la fase S del ciclo celular, mientras que permanecen dispersas en el núcleo en las fases G1 y G2/M (Calderano *et al.*, 2011). Considerando la asociación de FEN1 y PCNA durante la replicación del DNA (Dovrat *et al.*, 2014; MacNeill, 2016), esperábamos que TcFEN1 pudiese estar concentrada en la periferia nuclear en los parásitos transfectados en fase de crecimiento exponencial. En efecto, TcFEN1 fue encontrada en agregados similares a los descritos para las proteínas PCNA y Orc (Calderano *et al.*, 2011), aunque no exclusivamente en la periferia nuclear. Este hallazgo puede ser explicado considerando que se usaron cultivos asincrónicos de parásitos que sobreexpresan TcFEN1, a que se trabajó con proteínas recombinantes de fusión HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS, o ambas cosas a la vez. Estos agregados también pueden deberse a la interacción de TcFEN1 con PCNA y/o Orc1/Cdc6 (Godoy *et al.*, 2009). Es de interés considerar que las proteínas de reparación del DNA TcAPE1 y TcAPE2 (Sepúlveda *et al.*, 2014) así como TcNth1 (Ormeño *et al.*, 2016) fueron encontradas en agregados similares en el núcleo de *T. cruzi*, sugiriendo que las enzimas involucradas en la replicación y reparación del DNA se comportan como un mecanismo relacionado, como se ha propuesto (Godoy *et al.*, 2009). Consecuentemente, los agregados pueden ser el resultado del

reclutamiento de enzimas involucradas en la replicación, como Orc, PCNA y TcFEN1, así como aquellas relacionadas a la reparación del DNA, como TcAPE1, TcAPE2, TcNth1 y la misma TcFEN1, a regiones de replicación del DNA en el núcleo de tripanosomas en división.

Aunque hFEN1 presenta una secuencia de localización nuclear NLS (Qiu *et al.*, 2001; De Barros *et al.*, 2012; Finger *et al.*, 2012; Balakrishnan & Bambara, 2013), la actividad flap endonucleasa también fue encontrada en la mitocondria en líneas celulares humanas (Akbari *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Kalifa *et al.*, 2009). En nuestro caso, no se detectó presencia de las proteínas de fusión TcFEN1-GFP en el kinetoplasto del parásito. Esto no es inesperado, tomando en consideración que proteínas como TcOrc1/Cdc y TcPCNA están contenidas solamente en el núcleo (Godoy *et al.*, 2009; Calderano *et al.*, 2011). Similarmente, proteínas que participan de la vía BER de reparación del DNA, como TcAPE1, TcAPE2 y TcNth1 también fueron localizadas solamente en el núcleo del parásito (Sepúlveda *et al.*, 2014; Ormeño *et al.*, 2016), mientras que TcOGG1 (otra enzima que participa en la vía BER) está presente en ambos compartimentos celulares (Furtado *et al.*, 2012; Machado-Silva *et al.*, 2016). Por otro lado, el no disponer de un anticuerpo específico anti-TcFEN1 impidió descartar algún efecto del dominio GFP de las proteínas de fusión en la localización de TcFEN1.

Otra enzima capaz de procesar flaps de DNA es DNA2, una helicasa/nucleasa que también participa en la replicación y reparación del DNA (Bae *et al.*, 2001; Duxin *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2008). Esta enzima procesa un flap de DNA generando un producto que no puede ser ligado directamente. DNA2 corta dentro de la región de hebra simple de un flap de DNA, requiriendo más procesamiento por parte de una flap endonucleasa para generar un producto que pueda ser ligado, como se observó en *S. cerevisiae* (Bae *et al.*, 2001). En líneas celulares humanas, DNA2 fue identificada como una enzima tanto nuclear como mitocondrial (Duxin *et al.*, 2009), o solo mitocondrial (Zheng *et al.*, 2008). DNA2 ha sido sugerida como un candidato para reemplazar a FEN1 y se ha mostrado que la actividad de FEN1 es estimulada por la actividad de DNA2 y viceversa (Zheng *et al.*, 2008). Dado que el DNA mitocondrial es un importante blanco para sufrir daño oxidativo y que nuestros hallazgos indican que TcFEN1 está localizada solamente en el núcleo de *T. cruzi*, es de interés estudiar si un homólogo de DNA2 o una proteína similar se encuentra en la mitocondria del parásito, como un potencial reemplazo de TcFEN1 en el procesamiento de los flaps de DNA en ese organelo.

En la mayoría de los eucariontes, FEN1 cumple importantes roles en el procesamiento de intermediarios de DNA que presentan un flap de DNA durante la replicación. En efecto, la sobreexpresión de TcFEN1 en epimastigotes, forma replicativa de *T. cruzi*, provoca un importante incremento en la proliferación del parásito. Este efecto no fue alterado por la posición una extensión de 8 histidinas

respecto a la secuencia aminoacídica de la proteína. Estos resultados fuertemente sugieren la participación de TcFEN1 en la correcta escisión de los flaps de DNA generados durante la replicación y procesamiento del DNA del parásito.

Respecto a la reparación del DNA por la vía BER, dos sub-vías han sido identificadas en mamíferos. Una denominada vía BER corta (SP-BER), que resulta en reparación del DNA por reemplazo de un solo nucleótido dañado. La otra sub-vía, llamada vía BER larga (LP-BER), consiste en la remoción de varios nucleótidos (2-10) además del nucleótido dañado, previos al sitio de ligación final del producto de DNA reparado (Klungland & Lindahl, 1997; Kim *et al.*, 1998; Gary *et al.*, 1999; Fortini & Dogliotti, 2007; Robertson, 2009). En mamíferos, aunque SP-BER se ha propuesto como la sub-vía de reparación principal, LP-BER aún da cuenta de una parte de la reparación del DNA (Dianov *et al.*, 1998). En bacterias, LP-BER es una vía de soporte menor (Dianov & Lindahl, 1994). En *S. cerevisiae* (Wang *et al.*, 1993; Blank *et al.*, 1994) y *P. falciparum* (Haltiwanger *et al.*, 2000), SP-BER está ausente y LP-BER es la principal vía de reparación del DNA. A la fecha, no hay reportes respecto a la presencia de la vía LP-BER en *T. cruzi*. En los resultados obtenidos a partir de los distintos experimentos y ensayos usados, no se observó un efecto de la sobreexpresión de TcFEN1 en la viabilidad de los epimastigotes sometidos a las condiciones de estrés oxidativo agudo, observándose una disminución de la viabilidad de forma concentración-dependiente respecto al H₂O₂ tanto en los cultivos de parásitos

que expresaban la proteína HIS-TcFEN1-GFP como los parásitos control. Tampoco se observaron mayores diferencias entre los resultados obtenidos con los tres distintos ensayos de viabilidad usados (MTT, Alamar Blue y PI). Es posible que las condiciones de estrés oxidativo agudo sobrepasen la capacidad de las vías de reparación de DNA del parásito, y siendo TcFEN1 un participante de los últimos pasos de la vía LP-BER, no logró tener un efecto gravitante en la sobrevivencia del parásito. Distinto fue el panorama cuando se expuso a los parásitos frente a condiciones de estrés oxidativo prolongado mediante el sistema glucosa/glucosa oxidasa. En estas condiciones, se observa un claro efecto de la sobreexpresión de TcFEN1, teniendo una mayor viabilidad aquellos parásitos que sobreexpresaron HIS-TcFEN1-GFP. Estas últimas observaciones sugieren una función de TcFEN1 en la reparación del daño al DNA por la vía LP-BER, como se ha observado en otros organismos. Un dato interesante al respecto fue la detección de actividad flap endonucleasa en los homogeneizados de tripomastigotes, forma celular no replicativa de *T. cruzi*, de forma similar a lo observado en los homogeneizados de epimastigotes y amastigotes (**Figura 5A**). Esto podría indicar que la enzima cumple un rol más allá de su participación en la replicación del DNA, como la reparación de esta macromolécula y la mantención de la integridad del genoma. Por otro lado, se han descrito otras funciones de hFEN1 en procesos metabólicos del DNA distintos de la replicación y reparación por la vía BER, como por ejemplo en la vía de reparación NIR (Ischenko *et al.*, 2002), la resolución de estructuras de DNA del tipo horquilla

("hairpin") y la fragmentación del DNA en la apoptosis, entre otros (Zheng *et al.*, 2011; Balakrishnan & Bambara, 2013), que aún quedan por investigar en *T. cruzi*.

Un experimento que habría ayudado a dilucidar los roles de TcFEN1 en *T. cruzi* corresponde a la obtención de amastigotes y tripomastigotes recombinantes que sobreexpresaran TcFEN1. Estos experimentos se intentaron pero sin éxito. Tampoco se observó la aparición espontánea de tripomastigotes que sobreexpresaran TcFEN1 en cultivos envejecidos, algo que sí ocurrió en distintas ocasiones en cultivos control y no transfectados envejecidos. Esto podría indicar que la presencia desregulada de TcFEN1 en determinadas etapas del ciclo celular de *T. cruzi* resulta en el bloqueo o interferencia en procesos tales como la diferenciación celular. En efecto, en células HL-60 se ha observado que la expresión de hFEN1 es más elevada en células que se encuentran en fase exponencial de proliferación que en células sincronizadas en las fases G1 o G2/M. También se ha observado que la expresión de hFEN1 disminuye considerablemente en células que han pasado por un proceso de diferenciación celular (Kim, 1998). Estos datos indican que existe un fuerte control en la expresión de hFEN1 a lo largo de las distintas etapas del ciclo celular, por lo que no es de extrañar que en nuestro modelo la sobreexpresión de TcFEN1 pudiese interferir en procesos tales como la metaciclogénesis de los parásitos. Las dificultades en la obtención de lisados de los distintos estadios celulares del parásito que mantuviesen la actividad flap endonucleasa de mejor forma, sumado a no tener disponible un anticuerpo específico contra TcFEN1, impidieron poder

contrastar los niveles de expresión de la enzima TcFEN1 endógena con la actividad específica de la enzima en cada etapa del ciclo celular del parásito, lo que habría permitido indagar respecto a la regulación de la expresión y actividad de TcFEN1 en *T. cruzi*.

Comentarios publicados por Finger *et al.*, 2012, indican que la expresión de hFEN1 recombinantes con extensiones en la zona N-terminal resultaban en proteínas insolubles, inactivas o con muy baja actividad. Esto podría explicar los resultados obtenidos en *E. coli*, donde no se pudo obtener TcFEN1 soluble y activa con una extensión de 6 histidinas en el extremo N-terminal (**Figura 9**). En contraste, las proteínas recombinantes HIS-TcFEN1-GFP y TcFEN1-GFP-HIS fueron expresadas y purificadas exitosamente desde epimastigotes de *T. cruzi*, presentando ambas actividades similares (**Figura 11**). Estos resultados indican que, a pesar de la presencia de una extensión de 8 histidinas en el extremo N-terminal de HIS-TcFEN1-GFP, en *T. cruzi* se produce el correcto plegamiento y expresión de la proteína, probablemente por la presencia de proteínas chaperonas adecuadas, ausentes en el sistema de expresión bacterial usado.

7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados nos indican la presencia y actividad de una enzima flap endonucleasa (TcFEN1) en *T. cruzi*, actividad que se observó en las distintas formas celulares del parásito, lo que indica la importancia de esta enzima en el metabolismo de *T. cruzi* durante todo su complejo ciclo vital. La identificación en el genoma del parásito de una secuencia correspondiente a una flap endonucleasa permitió su clonamiento, para posteriormente generar proteínas de fusión TcFEN1-GFP en epimastigotes de *T. cruzi* que presentaron actividad flap endonucleasa, corroborando la identidad de la secuencia encontrada.

El análisis por microscopía de fluorescencia indicó que TcFEN1-GFP solo se encuentra en el núcleo de los parásitos, aún en aquellos expuestos a agentes oxidantes. Esto nos indica que la proteína TcFEN1 endógena también se encontraría en el núcleo de los parásitos, pero se necesitan experimentos adicionales para determinar la presencia de la enzima endógena en la mitocondria de *T. cruzi*.

Los parásitos que sobreexpresan TcFEN1-GFP presentaron una mayor proliferación respecto a lo observado en los parásitos control, así como una mayor sobrevivencia al ser expuestos a H₂O₂ de forma sostenida. Esto se condice con los roles conocidos de FEN1 en la replicación del DNA y su reparación a través de la vía BER larga, pero al ser tanto la proliferación como la sobrevivencia

frente a agentes oxidantes y parámetros indirectos de tales procesos, se necesitan ensayos específicos para confirmar que efectivamente TcFEN1-GFP interviene en la replicación y reparación del DNA de *T. cruzi*.

La detección de una flap endonucleasa en *T. cruzi* (TcFEN1), la presencia de un dominio C-terminal divergente en esta enzima parasitaria respecto a hFEN1, y una futura caracterización bioquímica en profundidad de TcFEN1 podrían otorgar un blanco potencial para desarrollar nuevos fármacos y terapias que ayuden a controlar y combatir la infección por *T. cruzi*, eucarionte ancestral que continúa presentando desafíos tanto a nivel de investigación como de tratamiento médico.

8. REFERENCIAS

- Abramoff, M., Magalhaes, P. & Ram, S. (2004). "Image processing with ImageJ". *Biophotonics International*, 11(7): 36-42.
- Akbari, M., Visnes, T., Krokan, H. & Otterlei, M. (2008). "Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis". *DNA Repair*, 7: 605-616.
- Asagochi, K., Tano, K., Chastain II, P., Adachi, N., Sonoda, E., Kikuchi, K., Koyama, H., Nagata, K., Kaufman, D., Takeda, S., Wilson, S., Watanabe, M., Swenberg, J. & Nakamura, J. (2010). "FEN1 functions in long patch base excision repair under conditions of oxidative stress in vertebrate cells". *Molecular Cancer Research*, 8: 204-215.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B., Carrington, M., Depledge, D., Fisscher, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M., *et al.* (2010). "TritrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae". *Nucleic Acids Research*, 38: D457-D462.
- Bae, S., Kim, J., Choi, E., Lee, K., Kang, H., Kim, H., Kim, J., Bae, K., Cho, Y., Park, C. & Seo, Y. (2001). "Tripartite structure of *Saccharomyces cerevisiae* Dna2 helicase/endonuclease". *Nucleic Acid Research*, 29(14): 3069-3079.
- Balakrishnan, L. & Bambara, R. (2013). "Flap endonuclease 1". *Annual Review of Biochemistry*, 82: 119-138.
- Bern, C. & Montgomery, S. (2009). "An estimate of the burden of Chagas Disease in the United States". *Clinical Infectious Diseases*, 49.
- Blank, A., Kim, B. & Loeb, L. (1994). "DNA polymerase δ is required for base excision repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*". *PNAS*, 91: 9047-9051.
- Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowers, R. N., *et al.* (2011). "DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(1): 186-200.

- 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*". *Journal of Cellular Biochemistry*, 112: 2189-2199.
- Calderano, S., Godoy, P., Motta, M., Mortara, R., Shenkman, S. & Elias, C. (2011). "*Trypanosoma cruzi* DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery". *Nucleus*, 2(2): 136-145.
- Calderano, S., Drosopoulos, W., Quaresma, M., Marques, C., Kosiyatrakul, S., McCulloch, R., Schildkraut, C. & Elias, M. (2015). "Single molecule analysis of *Trypanosoma brucei* DNA replication dynamics". *Nucleic Acids Research*, 43(5): 2655-2665.
- Calvet, C., Melo, T., Garzoni, L., Oliveira, F., Silva, D., Meirelles, M. & Pereira, M. (2012). "Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction". *Frontiers in Immunology*, 3, artículo 327.
- Camargo, E. (1964). "Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 6: 93-100.
- Cardoni, R., Rottenberg, M. & Segura, E. (1990). "Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*". *Cellular Immunology*, 128(1): 11-21.
- Cardoni, R., Antunez, M., Morales, C. & Nantes, I. (1997). "Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*". *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 56(3): 329-334.
- Casta, L., Buguliskis, J., Matsumoto, Y. & Taraschi, T. (2008). "Expression and biochemical characterization of the Plasmodium falciparum DNA repair enzyme, flap endonuclease-1 (PfFEN-1)". *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157: 1-12.
- Chapados, B., Hosfield, D., Han, S., Qiu, J., Yelent, B., Shen, B. & Tainer, A. (2004). "Specificity and PCNA-mediated activation in DNA replication and repair". *Cell*, 116: 39-50.
- De Barros, A., Takeda, A., Chang, C., Kobe, B. & Fontes, M. (2012). "Structural basis of nuclear import of flap endonuclease 1 (FEN1)". *Acta Crystallographica*, D68: 743-750.

- De Souza, W. (2002). "Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*". *Current Pharmaceutical Design*, 8(4): 269-285.
- Demple, B. & De Mott, M. (2002). "Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions". *Oncogene*, 21(58): 8926-34.
- Dianov, G. & Lindhal, T. (1994). "Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway". *Current Biology*, 4: 1069-1076.
- Dianov, G., Bischoff, C., Piotrowsky, J. & Bohr, V. (1998). "Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts". *The Journal of Biological Chemistry*, 273(50): 33811-33816.
- Dovrat, D., Stodola, J., Burgers, P. & Aharoni, A. (2014). "Sequential switching of binding partners on PCNA during in vitro Okazaki fragment maturation". *PNAS*, 111(39): 14118-14123.
- Duxin, J., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J., Splebrink, J. & Stewart, S. (2009). "Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein". *Molecular and Cellular Biology*, 29(15): 4274-4282.
- El-Sayed, N., *et al.* (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease". *Science*, 309:409-414.
- Finger, D., Atack, J., Tsutakawa, S., Classen, S., Tainer, J., Grasby, J. & Shen, B. (2012). "The wonders of flap endonucleases: structure, function, mechanism and regulation". *The Eukaryotic Replisome: A Guide to Protein Structure and Function*, Subcellular Biochemistry 62, Chapter 16.
- Fortini, P. & Dogliotti, E. (2007). "Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways". *DNA Repair*, 6(4): 398-409.
- Fragoso, S., Mattei, D., Hines, J., Ray, D., & Goldenberg, S. (1998). "Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase". *Molecular and Biochemical Parasitology*, 94(2): 197-204.
- Fredslund, J. (2006). "PHY-FI: Fast and easy online creation and manipulation of phylogeny color figures". *BMC Bioinformatics*, 7:315-322.
- Friedrich-Heineken, E., Henneke, G., Ferrari, E. & Hübscher, U. (2003). "The acetyltable lysines of human FEN1 are important for endo- and exonuclease activities". *Journal of Molecular Biology*, 328: 73-84.
- Furtado, C., Kunrath-Lima, M., Rajao, 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". *Parasitology Today*, 14(2): 64-70.
- Gary, R., Kim, K., Cornelius, H., Park, M. & Matsumoto, Y. (1999). "Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair". *The Journal of Biological Chemistry*, 274(7): 4354-4363.
- Godoy, P., Nogueira-Junior, L., Paes, L., Cornejo, A., Miyazawa, R., Silber, A., Schenkman, S. & Elias, C. (2009). "Trypanosome prereplication machinery contains a single functional Orc1/Cdc6 protein, which is typical of Archaea". *Eukaryotic Cell*, 8(10): 1592-1603.
- Gupta, S., Bhatia, V., Wen, J., Wu, Y., Huang, M. & Garg, N. (2009). "*Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes". *Free Radical Biology and Medicine*, 47:1414-1421.
- Graca-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 Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 322-335.
- Grisard, E., Ribeiro, S., Paula de Almeida, L., Stoco, P., Lehmkuhl, A., Talavera-López, C., Cunha, O., Andersson, B. & de Vasconcelos, A. (2014). "*Trypanosoma cruzi* clone Dm28c draft genome sequence". *Genome Announcements*, 2(1): e01114-13.
- Gros, L., Sapparbaev, M. K., & Laval, J. (2002). "Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage". *Oncogene*, 21(58): 8905-25.
- Gros, L., Ishchenko, A., Ide, H., Elder, R. & Sapparbaev, M. (2004). "The major human Ap endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway". *Nucleic Acids Research*, 32(1):73-81.
- Haltiwanger, B., Matsumoto, Y., Nicolas, E., Dianov, G., Bohr, V. & Taraschi, T. (2000). "DNA base excision repair in human malaria parasites is predominantly by a long-patch pathway". *Biochemistry*, 39(4): 763-772.
- Harrington, J. & Lieber, M. (1994). "The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease". *The EMBO Journal*, 13(5): 1235-1246.

- Hasan, S., Stucki, M., Hassa, P., Imhof, R., Gehrig, P., Hunziker, P., Hübscher, U. & Hottiger, M. (2001). "Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300". *Molecular Cell*, 7: 1221-1231.
- Hecker, H., Betschart, B., Bender, K., Burri, M., & Schlimme, W. (1994). "The chromatin of trypanosomes". *International Journal for Parasitology*, 24: 809-819.
- Henneke, G., Koundrioukoff, S. & Hübscher, U. (2003). "Phosphorilation of human FEN1 by cyclin-dependent kinase modulates its role in replication fork regulation". *Oncogene*, 22: 4301-4313.
- Hicks, G. & Raikhel, N. (1995). "Protein import into the nucleus: an integrated view". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11:155-188.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). "VMD: Visual molecular dynamics". *Journal of Molecular Graphics*, 14: 33-38.
- Ischenko, A. & Saparbaev, M. (2002). "Alternative nucleotide incisión repair pathway for oxidative DNA damage". *Nature*, 415:183-187.
- Kalifa, L., Beutner, G., Phadnis, N., Sheu, S. & Sia, E. (2009). "Evidence for a role of FEN1 in maintaining mitochondrial DNA integrity". *DNA Repair*, 8: 1242-1249.
- Kao, H., Henricksen, L., Liu, Y. & Bambara, R. (2002). "Cleavage specificity of *Sacharomyces cerevisiae* flap endonuclease 1 suggests a double-flap structure as the cellular substrate". *The Journal of Biological Chemistry*, 277(17): 14379-14389.
- Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M. & Sternberg, M. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis". *Nature Protocols*, 10(6): 845-850.
- Kim, I. (1998). "Down-regulation of human FEN-1 gene expression during differentiation of promyelocytic leukemia cells". *Experimental and Molecular Medicine*, 30(4): 252-256.
- Kim, K., Biade, S. & Matsumoto, Y. (1998). "Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair". *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15): 8842-8848.

- Klungland, A. & Lindhal, T. (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)". *The EMBO Journal*, 16(11): 3341-3348.
- Li, Z. (2012). "Regulation of the cell division cycle in *Trypanosoma brucei*". *Eukaryotic Cell*, 11(10):1180-90.
- Lima, F., Oliveira, P., Mortara, R., Silveira, J. & Bahia, D. 2010. "The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells?". *New Biotechnology*, 27(6): 837-843.
- Liu, Y., Kao, H. & Bambara, R. (2004). "Flap endonuclease 1: A central component of DNA metabolism". *Annual Review of Biochemistry*, 73:589-615.
- Liu, P., Qian, L., Sung, J., de Souza-Pinto, N., Zheng, L., Bogenhagen, D., Bohr, V., Wilson III, D., Shen, B. & Demple, B. (2008). "Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria". *Molecular and Cellular Biology*, 28: 4975-4987.
- Lu, A., Li, X., Gu, Y., Wright, P. & Chang, D. (2001). "Repair of oxidative DNA damage". *Cell Biochemistry and Biophysics*, 35:141-170.
- Machado-Silva, A., Goncalves, P., Grazielle-Silva, V., Ramos, F., de Figueiredo, E., Ribeiro, S. & Machado, C. (2016). "How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways". *Mutation Research*, 767: 8-22.
- MacNeill, S. (2016). "PCNA-binding proteins in the archaea: novel functionality beyond the conserved core". *Current Genetics*, 62: 527-532.
- Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. & Gómez-Barrio, A. (2000). "Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes". *Parasitology Research*, 86(12): 999-1002.
- Nakai, K. & Horton, P. (1999). "PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization". *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1):34-36.
- Notredame, C., Higgins, D. & Heringa, J. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment". *Journal of Molecular Biology*, 302: 205-217.

- Ormeño, F., Barrientos, C., Ramirez, S., Ponce, I., Valenzuela, L., Sepúlveda, S., Bitar, M., Kemmerling, U., Machado, C., Cabrera, G. & Galanti, N. (2016). "Expression and the peculiar enzymatic behavior of the *Trypanosoma cruzi* NTH1 DNA glycosylase". *PLoS ONE*, 11(6): e0157270.
- Paes, M., Cosentino-Gomes, D., de Souza, C., Nogueira, N., & Meyer-Fernandes, J. (2011). "The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*". *Journal of Parasitology Research*, 2011: ID 174614.
- Passos-Silva, D., Andrade, M., Nascimento de Aguiar, P., Vieira-da-Rocha, J., Machado, C. & Furtado, C. (2010). "Overview of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*". *Journal of Nucleic Acids*, 2010: ID 840768.
- Peluffo, G., Piacenza, L., Irigoín, F., Alvarez, M. & Radi, R. (2004). "L-Arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells". *Trends in Parasitology*, 20(8): 363-369.
- Piacenza, L., Alvarez, M., Peluffo, G. & Radi, R. (2009). "Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection". *Current Opinion in Microbiology*, 12: 415-421.
- Qiu, J., Li, X., Frank, G. & Shen, B. (2001). "Cell cycle-dependent and DNA damage-inducible nuclear localization of FEN1 nuclease is consistent with its dual functions in DNA replication and repair". *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7):4901-4908.
- Qiu, J., Bimston, D., Partikian, A. & Shen, B. (2002). "Arginine residues 47 and 70 of human flap endonuclease-1 are involved in DNA substrate interactions and cleavage site determination". *The Journal of Biological Chemistry*, 277(27):24659-24666.
- Qiu, J., Liu, R., Chapados, B., Sherman, M., Tainer, J. & Shen, B. (2004). "Interaction interface of human flap endonuclease-1 with its DNA substrates". *The Journal of Biological Chemistry*, 279(23): 24394-24402.
- Robertson, A., Klungland, A., Rognes, T. & Leiros, I. (2009). "DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6): 981-993.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J. & Gómez-Barrio, A. (2006). "Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes". *Parasitology Research*, 99:103-107.

- Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Hamada, K., Okada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H. & Hakoshima, T. (2005). "Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA". *The EMBO Journal*, 24:683-693.
- Schmunis, G. & Yadon, Z. (2010). "Chagas Disease: A Latin American health problem becoming a world health problem". *Acta Tropica*, 115: 14-21.
- Sepulveda, S., Valenzuela, L., Ponce, I., Sierra, S., Bahamondes, P., Ramirez, S., Rojas, V., Kemmerling, U., Galanti, N. & Cabrera, G. (2014). "Expression, functionality, and localization of apurinic/aprimidinic endonucleases in replicative and non-replicative forms of *Trypanosoma cruzi*". *Journal of Cellular Biochemistry*, 115: 397-409.
- Shen, B., Nolan, J., Sklar, L. & Park, M. (1996). "Essential amino acids for substrate binding and catalysis of human flap endonuclease 1". *The Journal of Biological Chemistry*, 271(16): 9173-9176.
- Solari, A.J. (1980a). "Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*". *Experimental Cell Research*, 127: 457-460.
- Solari, A.J. (1980b). "The 3-dimensional fine structure of mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*". *Chromosoma*, 78: 239-255.
- Stucki, M., Jónsson, Z. & Hübscher, U. (2001). "In eukaryotic flap endonuclease 1, the C terminus is essential for substrate binding". *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 7843-7849.
- Teixeira, A., Nascimento, R., & Sturm, N. (2006). "Evolution and pathology in chagas disease - a review". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(5): 463-91.
- Teixeira, A. Hecht, M., Guimaro, M., Sousa, A., & Nitz, N. (2011). "Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity". *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3): 592-630.
- Tiengwe, C., Marques, C. & McCulloch, R. (2014). "Nuclear DNA replication initiation in kinetoplastid parasites: new insights into an ancient process". *Trends in Parasitology*, 30: 27-36.
- Tomlinson, C., Atack, J., Chapados, B., Tainer, J. & Grasby, J. (2010). "Substrate recognition and catalysis by flap endonucleases and related enzymes". *Biochemical Society Transactions*, 38: 433-437.

- Tsutakawa, S., Classen, S., Chapados, B., Arvai, A., Finger, L., Guenther, G., Tomlinson, C., Thompson, P., Sarker, A., Shen, B., Cooper, P., Grasby, J. & Tainer, J. (2011). "Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily". *Cell*, 145: 198-211.
- Tyler, K. & Engman, D. (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited". *International Journal for Parasitology*, 31: 472-481.
- Wang, Z., Wu, X. & Friedberg, E. (1993). "DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase ϵ and is influenced by DNA polymerases α and δ in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and Cellular Biology*, 13(2): 1051-1058.
- WHO WHO (2017). Fact sheet "Chagas disease (American trypanosomiasis)".
- Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Li, M., Singh, P., Qiu, J., Tsark, W., Huang, Q., Kernstine, K., Zhang, X., Lin, D. & Shen, B. (2007). "FEN1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers". *Nature Medicine*, 13: 812-819.
- Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D., Demple, B. & Shen, B. (2008). "Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replicon and repair intermediates". *Molecular Cell*, 32: 325-336.
- Zheng, L., Jia, J., Finger, L., Guo, Z., Zer, C. & Shen, B. (2011). "Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer". *Nucleic Acids Research*, 39(3): 781-794.

ANEXO I

T. cruzi CL Brener:

ATGGGGATCTTGGGTCTTTGGAAGCTGCTTTATGACCGATCACCTGCTGCCATTTCGTGAGCGTGAAGTGAAGAATA
CTTTGGCCGTCGCATTGCCATTGATGCCTCCATGACGATATA **T**CAATTCATCATTGCGATGAAGGGATTTTCAGGATG
GGCAGGGGATGGAAGTACGAATGAGGCGGGGGAGGTCACGTCACATTTGAACGGTCTTTTTGCCCG **C**ACTTTGC
GAATGGTGGACGAGGGCCTGAGACCGATCTACGTTTTTACGGTAAACCACCCACGCTGAAGGCATCGGAGCTAC
AAGAGAG **A**CGACAGAGAGCGGAAGAGGCGCAGCAGTTGTTTGACACGGC **T**AAGGAGGAGGAAATGATGAGCT **G**A
TGGAGAAGATGAGCAAGCGCACTGTGCGGGTTTCAAGGGAGCAGTTGGAAGAGGCGAAAAAACTGCTTCAACTGAT
GGGCATTTCCGTTGTTTCAGGCGCCATCCGAGGCTGAGGCGCAGTGC GCGGAGCTGGTGAAGAAG **AAA**AAGGCCT
GGGCCGTTGCGACGGAGGACATGGACGCACTTACTTTTTGGGGC **A**CCGGTATGCTTCGGCACCTGACATATAGTG
AGGCAAAGAAGCGCCCCATTGCGGAGTTTACCTGGATGAGATTTTGGGCATAACCGGGTTGACAATGACACAATT
TATCGACCTTTGCATTTTACTTGGCTGTGATTACGTGCCCAAGATC **CCG**GGCATTGGTCCACAGAAGGCGTGGGAG
GGCATCAAGAAGCATGGCGACATTGAAACGCTTCTTCAGTCTCTTGATGCCGGGAG **A**CACAGCGTGCCCGAGGGC
TTTCACTACGAGGAGGCGCAGCAGTTTTTCTTAAACCTGAGGTGACTCCAGCTGAGGAAATTGAAATTCAGTTTCG
TGAGCCTGACGAGGAGGGTCTTGT **AAG**TTTTCTTGTGGA **G**GAGAAACTGTTCAATAAGGATCGGGTCTGAAGGGG
ATTCAACGGCTCCGAAACGCACTGACACGAAAAACAGGGTCTGCTGGACCAGTTTTTTACCATCACAAGGCCGG
TGACGAAACCCAACACCTGCGATGCAAAGGCCGGTGTGAAGAGGGGTCATAGCGCCAT **T**GCCTTGTGCGGGGACGC
TGCAGCAAAAAGGGTCTCCGGGCACAAAAAGGTGGTTAAGAAATA

T. cruzi Dm28c:

ATGGGGATCTTGGGTCTTTGGAAGCTGCTTTATGACCGATCACCTGCTGCCATTTCGTGAGCGTGAAGTGAAGAATA
CTTTGGCCGTCGCATTGCCATTGATGCCTCCATGACGATATA **C**CAATTCATCATTGCGATGAAGGGATTTTCAGGATG
GGCAGGGGATGGAAGTACGAATGAGGCGGGGGAGGTCACGTCACATTTGAACGGTCTTTTTGCCCG **A**ACTTTGC
GAATGGTGGACGAGGGCCTGAGACCGATCTACGTTTTTACGGTAAACCACCCACGCTGAAGGCATCGGAGCTAC
AAGAGAG **G**CGACAGAGAGCGGAAGAGGCGCAGCAGTTGTTTGACACGGC **C**AAGGAGGAGGAAATGATGAGCT **T**A
TGGAGAAGATGAGCAAGCGCACTGTGCGGGTTTCAAGGGAGCAGTTGGAAGAGGCGAAAAAACTGCTTCAACTGAT
GGGCATTTCCGTTGTTTCAGGCGCCATCCGAGGCTGAGGCGCAGTGC GCGGAGCTGGTGAAGAAG **AAA**AAGGCCT
GGGCCGTTGCGACGGAGGACATGGACGCACTTACTTTTTGGGGC **T**CCGGTATGCTTCGGCACCTGACATATAGTG
AGGCAAAGAAGCGCCCCATTGCGGAGTTTACCTGGATGAGATTTTGGGCATAACCGGGTTGACAATGACACAATT
TATCGACCTTTGCATTTTACTTGGCTGTGATTACGTGCCCAAGATC **TCG**GGCATTGGTCCACAGAAGGCGTGGGAG
GGCATCAAGAAGCATGGCGACATTGAAACGCTTCTTCAGTCTCTTGATGCCGGGAG **G**CACAGCGTGCCCGAGGGC
TTTCACTACGAGGAGGCGCAGCAGTTTTTCTTAAACCTGAGGTGACTCCAGCTGAGGAAATTGAAATTCAGTTTCG
TGAGCCTGACGAGGAGGGTCTTGT **GAG**TTTTCTTGTGGA **A**GAGAAACTGTTCAATAAGGATCGGGTCTGAAGGGG
ATTCAACGGCTCCGAAACGCACTGACACGAAAAACAGGGTCTGCTGGACCAGTTTTTTACCATCACAAGGCCGG
TGACGAAACCCAACACCTGCGATGCAAAGGCCGGTGTGAAGAGGGGTCATAGCGCCAT **A**GCCTTGTGCGGGGACGC
TGCAGCAAAAAGGGTCTCCGGGCACAAAAAGGTGGTTAAGAAATA

Secuencias nucleotídicas de TcFEN1 de las cepas CL Brener y Dm28c. Se indican las secuencias nucleotídicas correspondientes a TcFEN1 de la cepa CL Brener encontrada en las bases de datos, y de la cepa Dm28c, descrita en el presente trabajo. En rojo se destacan las bases distintas entre las dos secuencias (12 en total) y se enmarcan aquellas modificaciones que resultan en cambios en las secuencias aminoacídicas deducidas obtenidas a partir de estas secuencias: Lys147 (CL Brener) por Asn (Dm28c), Pro243 (CL Brener) por Ser (Dm28c) y Lys312 (CL Brener) por Glu (Dm28c).

ANEXO II



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

Santiago, June 17th 2008.-

To:
**FONDECYT PROGRAM
PRESENT**

Dear Sirs

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

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

Receiving acknowledgement: Professor Norbel Luis Galanti Garrone

Professor Mónica Acuña Patzke
Risk Prevention and Biosafety Unit Director

* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project

c.c.

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

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

ANEXO III



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS PROF. DR. EDUARDO CRUZ-COKE LASSABE
PROGRAMA DISCIPLINARIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

Certification on Biosafety and Radiation Safety

Santiago, Chile June 24, 2008

In agreement with the official indications of Annex IX, and in my capacity as Principal Investigator of this Proposal, I certify:

1. The laboratory where the *Trypanosoma cruzi* infective forms (trypomastigotes) will be handled, has a certified Biosafety level II issued by the "Unit of Risk Prevention and Biosecurity of the Faculty of Medicine".
2. Chemical wastes will be sent to the same Biosecurity and Risk Prevention Unit and then to the company HIDRONOR (also authorized by the "SEREMI de Salud ex-SESMA") for disposal.
3. Each chemical reagent in the laboratory is properly inventoried according to the guide: "Inventario de Productos Químicos, Facultad de Medicina" and has its own security tab, which is provided by the manufacturer (NCh 2245) or downloaded (<http://www.fichasdeseguridad.com/>; <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/spanish.htm>).
4. Ethidium bromide and acrylamide will be eliminated according to the "Manual de Normas de Bioseguridad", edited 2008 by CONICYT.
5. In the case of accidents the Faculty of Medicine has a medical attention agreement with the "Asociación Chilena de Seguridad" for the Faculty Members. Undergraduate students are protected by law 16744 and, should it be necessary, they will be attended at the "Hospital San José".
6. With regard to those procedures utilizing radioisotopes:
 - 6.1. Our laboratories at the ICBM have the necessary facilities. The room for these procedures is exclusive and isolated from other facilities. Among other safety characteristics, their concrete walls, floor and ceilings are 30 cm thick. The room has a negative flow hood, with an exhaust system passing through a granulated activated 10cm thick charcoal filter, periodically renovated. All implements (pipettes, rotators, pumps, holders, racks, etc) are used exclusively in this room.
 - 6.2. Radioactive wastes will be decayed in proper containers, according to the isotope. Decayed wastes will be removed by the Chilean Atomic Energy Commission
 - 6.3. Only authorized personnel, properly informed, dressed and trained has access to these Facilities.
 - 6.4. All procedures with radioisotopes will be executed by Mr. Álvaro Rojas who has an Official current License. Mr. Rojas is a Biologist, Licensed at the Pontifical Catholic University of Chile, recruited at the ICBM for 10 years now.

Prof. Dr. Norbel Galanti
Principal Investigator

ANEXO IV



Solicitud N° 33353/11
IOM/CCS/cgp.-

EXENTA N° **043514**
SANTIAGO, 01 AGO 2011

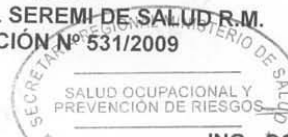
VISTOS:

Estos antecedentes; la solicitud N° 33353 del 19 de Julio del 2011, presentada por don **IVÁN ALEXIS PONCE LÓPEZ, R.U.T. N° 13.920.218-K**, mediante la cual solicita autorización de desempeño en instalaciones radiactivas de 2ª categoría, en laboratorios de baja radiotoxicidad; **CONSIDERANDO:** Lo informado por funcionario del Subdepartamento Salud Ocupacional y Prevención de Riesgos de esta autoridad sanitaria; las Circulares N° 2C/213 de 1983 y N° 3H/103 de 1985; los D.S. N° 133/84 y N° 3/85; el artículo 1º, N° 39 del D.F.L. N° 1 de 1989, todos del Ministerio de Salud; **Y TENIENDO PRESENTE** lo dispuesto en los artículos 1, 3, 9, 82 y 86 del Código Sanitario; y en uso de las facultades que me confiere el D.F.L. N° 1 de 2005, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del D.L. N° 2763/79 y el D.S. N° 136/04 del Ministerio de Salud que aprobó el Reglamento Orgánico de esta Secretaría de Estado; dicto la siguiente:

RESOLUCIÓN

- 1.- **AUTORIZÁSE** a don **IVÁN ALEXIS PONCE LÓPEZ, R.U.T. N° 13.920.218-K, BIOQUÍMICO**, domiciliado en calle Santa Alicia N° 3110, comuna de Recoleta, para desempeñarse en instalaciones radiactivas de segunda categoría, **en laboratorios de baja radiotoxicidad.**
- 2.- **En el desempeño de su labor en dichas instalaciones**, se deberá cumplir con las normas básicas de protección radiológica establecidas en el D.S. N° 3/85 del Ministerio de Salud y en los procedimientos de protección radiológica de los lugares de trabajo en los cuales preste servicios.
- 3.- La presente Resolución tendrá una **validez de tres (3) años.**

ANÓTESE Y NOTIFÍQUESE
POR ORDEN DEL SEREMI DE SALUD R.M.
SEGÚN RESOLUCIÓN N° 531/2009



ING. OSVALDO HIDALGO JORQUERA
JEFE SUBDEPTO. SALUD OCUPACIONAL Y PREVENCIÓN DE RIESGOS
SECRETARÍA REGIONAL MINISTERIAL DE SALUD
REGIÓN METROPOLITANA

Distribución:
- Interesado
- Subdepto. Salud Ocupacional y Prevención de Riesgos
- Of. de Partes(c/ant)

MARGARITA PALMA PÉREZ
MINISTRO DE FE