



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN N-cMyc-TcAP1
COMO HERRAMIENTA PARA LA FUTURA
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN
CON LA ENDONUCLEASA APURÍNICA/APIRIMIDÍNICA**

TcAP1 DE *Trypanosoma cruzi*

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICA

LAURA ALICIA COFRÉ LORCA

Profesor patrocinante

Dra. Lorena García N.
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular.
Fac. Cs químicas y farmaceuticas.

Director de memoria

Dr. Gonzalo Cabrera V.
Laboratorio de Biología Molecular
y Celular, ICBM.
Fac. Medicina

Santiago-Chile, 2017

A Dios, mis padres y hermano.

~Todo es posible para el que cree~

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un camino arduo y difícil obtener mi título profesional de Bioquímica, trabajos extenuantes para solventar mis estudios, corriendo a veces sin comer, para llegar a tiempo. Trabajando casi todos los veranos, pero siempre tuve el apoyo de Dios, mis padres y hermano, sin ellos no hubiera podido concluir y cumplir mi sueño de ser un aporte a la sociedad chilena en el ámbito científico.

Agradezco al Dr. Gonzalo Cabrera y a Norbel Galanti por creer y apostar por mí. Por su constancia y apoyo en todo lo que se presentaba. Por los momentos de distensión y empatía vividos con el equipo de nuestro laboratorio. Agradezco a Sofía Sepúlveda, Lucía Valenzuela y Christian Hidalgo por su colaboración y por ser grandes ejemplos en mi formación como profesional en el tiempo que realizaba mi memoria de título.

Agradezco a la Dra. Lorena García por su apoyo como profesora patrocinante y a la excelente comisión evaluadora.

Hago mención honrosa a la Dra. Amalia Sapag Muñoz de la Peña, por el consejo que cambió la manera en que me veo como futura profesional, y que soy capaz de dar más: “No te sabotees, tú puedes dar mucho más”.

Muchas gracias, a cada una de las personas que ha sido un aporte a mi vida y a ser parte de mis sueños.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE GENERAL	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
SUMMARY	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.2 Transmisión, cuadro clínico y tratamiento.....	1
1.3 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	2
1.4 <i>T. cruzi</i> resistencia a estrés oxidativo y vía de reparación por escisión de bases.....	3
1.5 Estudios de la vía BER.....	3
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
2.1 Hipótesis.....	5
2.2 Objetivo General.....	5
2.3 Objetivos Operacionales.....	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1 Construcción de los vectores <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i> y <i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	6
3.1.1 Amplificación de los fragmentos nucleotídicos <i>(ha)₃-(flag)₃, tcap1</i> y <i>cmyc-tcap1</i>	6
3.1.2 Detección de los amplificados por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.....	7
3.1.3 Purificación de los amplificados <i>(ha)₃-(flag)₃, tcap1</i> y <i>cmyc-tcap1</i>	8
3.1.4 Digestión enzimática de restricción de amplificados y de vectores de expresión.....	8
3.1.5 Clonación de amplificados en vectores de expresión.....	9
3.1.6 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> JM109.....	9

3.1.7	Selección de colonias bacterianas transformadas.....	10
3.1.8	Verificación por secuenciación de la obtención de las construcciones esperadas.....	11
3.2	Obtención de epimastigotes que expresen N-(HA) ₃ -(FLAG) ₃ -TcAP1 y N-cMyc-TcAP1.....	12
3.2.1	Cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	12
3.2.2	Transfección y selección de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con las construcciones <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i> o <i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	12
3.2.3	Detección de la expresión de las proteínas N-(HA) ₃ -(FLAG) ₃ -TcAP1 o N-cMyc-TcAP1 en epimastigotes transfectados.....	13
3.3	Purificación e identificación de N-cMyc-TcAP1 recombinante y sus proteínas asociadas.....	14
3.3.1	Inmunoprecipitación de N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas...	14
3.3.2	Separación electroforética bidimensional de N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas.....	15
3.3.3	Espectrometría de masa de las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1	16
IV.	RESULTADOS	17
4.1	Construcción de los vectores <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i> y <i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	17
4.1.1	Construcción del vector <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i>	17
4.1.2	Construcción del vector <i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	20
4.2	Obtención de epimastigotes transfectantes.....	23
4.2.1	Expresión de la proteína N-(HA) ₃ -(FLAG) ₃ -TcAP1 en epimastigotes transfectados.....	23
4.2.2	Expresión de la proteína N-cMyc-TcAP1, en epimastigotes transfectados.....	26
4.3	Inmunoprecipitación de N-cMyc-TcAP1.....	29
4.4	Caracterización de las proteínas asociadas a TcAP1.....	31
V.	DISCUSIÓN	34
VI.	CONCLUSIONES	46
VII.	REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Partidores usados para obtener los insertos <i>(ha)₃-(flag)₃, tcap1</i> y <i>cmc-tcap1</i>	6
Tabla 2.	Detalle de los partidores usados en las PCR de colonias.....	11
Tabla 3.	Detalle del partidor usado en secuenciación automática de DNA.....	11
Tabla 4.	Caracterización del patrón electroforético 2D de proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Generación del vector <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃</i>	18
Figura 2.	Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la construcción <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃</i> , obtenida mediante secuenciación automática con la secuencia nucleotídica esperada.....	19
Figura 3.	Generación del vector <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i>	21
Figura 4.	Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la construcción <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i> obtenida mediante secuenciación automática, con la secuencia nucleotídica esperada.....	22
Figura 5.	Generación del vector <i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	24
Figura 6.	Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la construcción <i>pTREX-cmyc-tcap1</i> obtenida mediante secuenciación automática, con la secuencia nucleotídica esperada.....	25
Figura 7.	Detección de la expresión de la proteína N-(HA) ₃ -(FLAG) ₃ -TcAP1 en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados con la construcción <i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i>	27
Figura 8.	Detección de la expresión de la proteína N-cMyc-TcAP1 en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> transfectados con la construcción <i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	28
Figura 9.	Análisis de la inmunoprecipitación de N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas.....	30
Figura 10.	Patrón electroforético 2D de proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1.....	32

ABREVIATURAS

3'OH:	Hidroxilo posición 3'
5'dRP:	Desoxirribosa fosfato posición 5'
8-oxoG:	7,8-dihidro-8-oxoguanina
AP-1:	Proteína activadora 1
APE1:	Endonucleasa apurínica/apirimidínica humana 1
BCA:	Ácido bicinconínico
BSA:	Albúmina de suero bovino
CHAPS:	Hidrato 3-[(3-coamidapropil) dimetilamonio]-1-propanosulfato
c-Myc:	Epítoto derivado de genes cmyc
CREB:	<i>cAMP response element-binding</i>
EgR-1:	Proteína de respuesta temprana al crecimiento 1
FEN-1:	Flap endonucleasa 1 humana
FLAG:	Epítoto sintético flag
G-418:	Geneticina
GADD45A:	Proteína inducible por DNA dañado y detención del crecimiento
GAPDH:	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HA:	Epítoto hemaglutinina
HEPES:	Amortiguador ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano sulfónico
HIF-1:	Factor 1 inducible por hipoxia
Hsp70:	Proteínas de estrés térmico de 70 kDa
INCOSUR-Chagas:	Iniciativa de Salud del Cono Sur-Chagas
iNOS:	Enzima óxido nítrico reductasa inducible
IP25:	Solución comercial para inmunoprecipitación 25x
MDM2:	<i>Mouse double minute 2 homolog protein</i>
Medio LIT:	<i>Liver infusion medium</i>
NADPH oxidasa:	Complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NFκ-B:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NTH1:	Proteína 1 similar a la endonucleasa III humana

OGG1:	Oxoguanina glicosilasa 1 humana
p53:	Proteína nuclear de 53 kDa
PARP:	<i>Procyclin acidic repetitive protein</i>
Pax:	<i>Paired box proteins</i>
PCNA:	Antígeno nuclear de células en proliferación
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRP19:	<i>pre-mRNA processing factor 19</i>
Ref-1:	Factor efector redox 1
RPA70:	Proteína de Replicación A
RLA0:	<i>Acidic ribosomal protein P0</i>
RSSA:	<i>NTE family protein RssA</i>
SFB:	Suero fetal bovino
TCA:	Ácido tricloroacético
TcAP1 y 2:	Endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 y 2 de <i>T. cruzi</i>
TcFEN1:	Flap endonucleasa 1 de <i>T. cruzi</i>
TcNTH1:	Proteína 1 similar a la endonucleasa III de <i>T. cruzi</i>
TcPol β y K:	DNA polimerasas beta y kappa de <i>T. cruzi</i>
TcOGG1:	Oxoguanina glicosilasa 1 de <i>T. cruzi</i> .
TFB1 y 2:	<i>Transcription Factor B 1 and 2</i>
Tmod3:	Tropomodulina 3 humana
XPA:	<i>DNA repair protein complementing XP-A cells</i>
XPG:	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency protein</i>

RESUMEN

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad posee un carácter endémico en América Latina y se estima un promedio de 8 millones de personas infectadas.

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra insectos vectores y mamíferos hospederos, en los cuales se diferencia en tres formas celulares finales: epimastigote (extracelular y replicativa) presente en los vectores triatomínicos; tripomastigote (extracelular no replicativa e infectiva) que se encuentra tanto en insectos vectores como en hospederos mamíferos; y amastigote (intracelular y replicativa) presente en hospederos mamíferos. En ambos hospederos, *T. cruzi* se encuentra sometido a la acción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) que dañan su DNA. No obstante, el parásito sobrevive a la acción del estrés oxidativo. En la mayoría de los eucariontes, el daño oxidativo al DNA es reparado principalmente por la vía de reparación por escisión de bases (BER), proceso conservado en el que participan una serie de proteínas con actividad enzimática, siendo fundamentales las endonucleasas apurínicas/apirimidínicas (endonucleasas AP).

En el genoma de *T. cruzi* se identificó la secuencia de la endonucleasa AP TcAP1, homóloga al endonucleasa AP de humano (APE1). Se demostró que la sobreexpresión de esta enzima incrementa la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes expuestos a ROS/RNS y que la inhibición de la actividad de TcAP1 genera el efecto opuesto; es decir, disminuye la viabilidad de los parásitos tratados con agentes oxidantes.

Actualmente, se sabe que APE1 humana se relaciona directamente con otras enzimas de la vía BER y modula la expresión de proteínas que participan de otras vías de reparación del DNA. Hasta el momento no se ha determinado si TcAP1 se asocia a otras proteínas, como ocurre con su ortóloga APE1 en humanos.

En esta memoria de título se propuso generar herramientas que permitan a futuro identificar las proteínas parasitarias asociadas a la endonucleasa TcAP1 de *T. cruzi*, las cuales podrían modular o ser moduladas por ella. Para tales efectos, se diseñaron dos construcciones plasmidiales (*pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*) con el objetivo de generar proteínas de fusión de TcAP1 asociadas a diferentes epítopes ((HA)₃-(FLAG)₃ o c-Myc). Estos vectores de expresión se transfectaron en

epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, los que se seleccionaron con el antibiótico G-418. Solo se obtuvieron epimastigotes transfectantes que expresaron la proteína de fusión N-cMyc-TcAPI, evidenciado mediante ensayos de *Western blot*. Utilizando un kit comercial (anti-cMyc), se realizaron ensayos de inmunoprecipitación sobre homogeneizados de proteínas totales obtenidas desde los epimastigotes transfectantes que expresan N-cMyc-TcAPI y epimastigotes control no transfectados. Las proteínas obtenidas se separaron mediante electroforesis bidimensional en condiciones desnaturantes con el objetivo de evidenciar patrones electroforéticos diferenciales entre parásitos transfectantes y controles. Las proteínas detectadas de manera exclusiva para los parásitos transfectantes se enviaron a identificar mediante espectrometría de masa, sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes. A pesar de los problemas presentados, esta memoria de título presenta una gran relevancia para nuestro laboratorio, ya que permitió generar herramientas para la futura identificación de proteínas reguladoras de la actividad de TcAPI o que son reguladas por ella.

SUMMARY

Generation of the fusion protein N-cMyc-TcAP1 as a tool for future identification of proteins that interact with the apurinic/apyrimidinic endonuclease TcAP1 of *Trypanosoma cruzi*

The etiologic agent of Chagas disease is the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). This disease is endemic in Latin America and an estimated 8 million people are infected.

The life cycle of *T. cruzi* involves triatomine insect vectors and mammalian hosts, in which it differs in three final cellular forms: epimastigote (extracellular and replicative) present in triatomine vectors; trypomastigote (non-replicative and infective extracellular form) found in both, insect vectors and mammalian hosts; and amastigote (intracellular and replicative) present in mammalian hosts only. Inside both hosts, *T. cruzi* is exposed to reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) that damage the parasite DNA, however the parasite survives. In most eukaryotes, oxidative DNA damage is repaired mainly by the base excision repair pathway (BER), a conserved mechanism, in which a series of proteins with enzymatic activity participate, being apurinic/apyrimidinic endonucleases (AP endonuclease) essential to this process.

In the *T. cruzi* genome the nucleotide coding sequence for an AP endonuclease (TcAP1), homologous to human AP endonuclease (APE1), was identified. In previous reports it has been demonstrated that the overexpression of this enzyme in *T. cruzi*, increases the viability of epimastigotes and trypomastigotes exposed to ROS/RNS and that the inhibition of TcAP1 activity generates the opposite effect, decreasing the parasite viability.

Currently, human APE1 is known to directly interact with other enzymes of the BER pathway and modulates the expression of proteins involved in other DNA repair pathways. To date, it has not been determined whether *T. cruzi* TcAP1 is associated with other proteins, similar to those reported for APE1 ortholog human protein.

In this work, it was proposed to generate tools that allow the future identification of parasitic proteins that interacts with the TcAP1 endonuclease, which could modulate their activity or or proteins that modulate their activity product of its interaction with TcAP1. For this purpose, two plasmid constructs (*pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* and

pTREX-cmyc-tcap1) were designed with the aim of generating TcAP1 fusion proteins associated with different tags ((HA)₃-(FLAG)₃ or c-Myc). These expression vectors were transfected into epimastigotes of the *T. cruzi* Y strain, which were selected with the G-418 antibiotic. Only transfectant epimastigotes expressing the N-cMyc-TcAP1 fusion protein, evidenced by *Western blot* assays, were obtained. Using a commercial kit (anti-cMyc), immunoprecipitation assays were performed on total protein homogenates obtained from transfectant epimastigotes expressing N-cMyc-TcAP1 and untransfected control epimastigotes. The proteins obtained were separated by two-dimensional electrophoresis under denaturing conditions with the aim of evidencing differential electrophoretic patterns between transfectant and control parasites. The proteins exclusively detected for the transfectant parasites were sent to be identified by mass spectrometry. However, these could not be identified. Despite the presented problems, this title memory presents a great relevance for our laboratory, since it allowed to generate tools for the future identification of proteins that interacts with the TcAP1 enzyme.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

La Enfermedad de Chagas es una patología endémica del continente americano causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y VI región de Chile (ISP, 2014). Sin embargo, debido a migraciones de personas infectadas a zonas no endémicas, se ha extendido a Canadá, Europa, Australia y Japón, (OPS, 2007). Se estima que alrededor de 8 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con el parásito y decenas de millones estarían en riesgo de contraer la enfermedad (OMS, 2016). Actualmente, la Enfermedad de Chagas se considera una dolencia reemergente y desatendida (OMS, 2016; Moncayo *et al.*, 2009), a pesar que desde 1993 se cataloga como la enfermedad parasitaria con mayor impacto socio-económico en América (Castro, 2014). En Chile se estima que existen alrededor de 98.000 habitantes infectados con *T. cruzi* y cerca de 850 mil personas en riesgo de contagio (ISP, 2014; Olea, 2009; Apt *et al.*, 2008).

1.2 Transmisión, cuadro clínico y tratamiento

A nivel global, el parásito se transmite principalmente a través de insectos vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae (*Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai*, entre otros). En el año 2000, Chile se declaró libre de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas debido a las iniciativas impulsadas por la OPS e INCOSUR-Chagas (ISP, 2014). Sin embargo, adquirieron mayor relevancia epidemiológica otras formas de transmisión del parásito, destacando la transmisión congénita (Ortiz *et al.*, 2012; Castro, 2014; Prata, 2001). Adicionalmente, existen otras formas de transmisión como las transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y la vía oral (consumo de alimentos contaminados con el parásito) (Castro, 2014; OPS, 2007; Toso *et al.*, 2011).

La enfermedad de Chagas presenta tres fases sucesivas: i) La fase aguda se inicia al momento de adquirir al parásito y tiene una duración de semanas a meses. Por lo general, esta etapa es asintomática (95% de los pacientes). En el caso de presentar síntomas, estos son inespecíficos como fiebre, anorexia y decaimiento, entre otros; ii) La fase indeterminada se caracteriza por ausencia de signos y síntomas. Puede tener una

duración variable de meses o años; iii) Finalmente, alrededor de un tercio de las personas portadoras ingresan a la fase crónica de la enfermedad, presentando lesiones irreversibles que afectan principalmente al corazón (90% de los casos). Además, se pueden presentar alteraciones del sistema digestivo (megaesófago y/o megacolon) o alteraciones del sistema nervioso. En esta etapa, la enfermedad puede ser inhabilitante o causar la muerte del paciente (Castro, 2014).

Benznidazol y Nifurtimox son los únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas (Murcia *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2013). No se conocen sus mecanismos de acción, son poco eficientes en la fase crónica de la enfermedad y generan numerosos efectos adversos (cefaleas, trombocitopenias, entre otros), que llevan al abandono del tratamiento (Bermudez *et al.*, 2016; Yun *et al.*, 2009). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y el desarrollo de nuevos fármacos es imperante.

1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando un insecto vector triatomino se alimenta de sangre de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes sanguíneos (forma extracelular no replicativa e infectiva). Estos últimos se diferencian a epimastigotes (forma extracelular replicativa, no infectiva), en el tubo digestivo anterior del vector. Posteriormente, los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatomino. Cuando el insecto se alimenta nuevamente de un mamífero, deposita sus heces con tripomastigotes metacíclicos sobre la piel del hospedero. Estos ingresan al hospedero, facilitado por el rascado de la zona de picadura, e invaden células del mamífero (principalmente macrófagos) diferenciándose a amastigotes (forma intracelular y replicativa) (Goes *et al.*, 2016). Tras sucesivas divisiones, se diferencian nuevamente a tripomastigotes sanguíneos que lisan la célula infectada, se liberan al torrente sanguíneo e invaden distintos órganos blanco como corazón y plexos nerviosos del tracto digestivo. El ciclo continúa cuando otro vector triatomino se alimenta de la sangre de este hospedero infectado (Cabrera *et al.*, 2011; Sepúlveda *et al.*, 2014).

1.4 *T. cruzi*: resistencia a estrés oxidativo y vía de reparación por escisión de bases

Todas las formas celulares de *T. cruzi* son capaces de sobrevivir a la exposición de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), tanto en el hospedero mamífero, como al interior del insecto vector (Graça-Souza *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009; Peluffo *et al.*, 2004). ROS/RNS generan modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas del DNA que llevan a la formación de 8-oxoG (bases purínicas), timina-glicol (bases pirimidínicas), entre otras. Este daño es reparado principalmente por la vía de reparación por escisión de bases (vía BER) (Fleck *et al.*, 2004; Jalal *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2016; Slupphaug *et al.*, 2003). Esta vía se resume en la acción de cuatro enzimas. La base dañada es reconocida por una DNA-glicosilasa que escinde la base nitrogenada, dejando un sitio apurínico/apirimidínico (AP). Este sitio es reconocido por una endonucleasa AP que hidroliza el enlace fosfodiéster generando un extremo 3' hidroxilo (3'OH) y un remanente 5' desoxirribosa-fosfato (5'dRP). La DNA polimerasa β escinde el 5'dRP e incorpora un nuevo nucleótido. Finalmente, una DNA ligasa sella la hebra (Robertson *et al.*, 2009).

1.5 Estudios de la vía BER en *T. cruzi*

El Laboratorio de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina de la U. de Chile, durante los últimos años se ha centrado en estudiar enzimas que participan en la vía BER de *T. cruzi*, como DNA-glicosilasas (TcNTH1 y TcOGG1) (Ramírez, 2012; Ormeño, 2016), Flap endonucleasa (TcFEN1) (Aldunate, 2016; Ponce, 2016) y endonucleasas AP (TcAP1, TcAP2) (Sepúlveda, 2012; Sepúlveda *et al.*, 2014; Delgadillo, 2011).

En relación a la endonucleasa TcAP1, se estableció que se encuentra activa en las tres formas celulares del parásito, localizándose exclusivamente en el núcleo de *T. cruzi*. Por otra parte, se determinó que el efecto citotóxico generado por ROS/RNS es significativamente mayor en epimastigotes y tripomastigotes incubados de manera simultánea con metoxiamina (inhibidor de la actividad de endonucleasa AP). Por otra parte, la sobreexpresión de TcAP1 incrementa la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes expuestos de forma aguda y sostenida a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y

peroxinitrito (ONOO⁻). Estos resultados sugieren que la vía BER se relaciona con la resistencia de *T. cruzi* al daño oxidativo del DNA, donde participa activamente la endonucleasa TcAP1 (Sepúlveda *et al.*, 2014; Cabrera *et al.*, 2011; Valenzuela, 2016).

TcAP1 es una enzima ortóloga de la endonucleasa APE1 de humanos. Se sabe que APE1 se relaciona directamente con proteínas de la vía BER y modula la expresión de proteínas que participan de otras vías como XPG, RPA70, XPA, TFB 1 y 2 (como co-activador transcripcional o asociándose a ellas, influyendo en la actividad de estas proteínas), requeridas en la vía de reparación por escisión de nucleótidos, NER (Kim *et al.*, 2015; Tell *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado si TcAP1 se asocia a otras proteínas, como ocurre con su ortóloga APE1 en humanos. Esto tendría gran relevancia, ya que podría dar cuenta de cómo es regulada la actividad de TcAP1, cómo esta endonucleasa regularía otras proteínas y/o si la endonucleasa AP TcAP1 intervendría en otras vías de reparación del DNA de *T. cruzi*.

En esta memoria de título se planeó la generación de herramientas que permitan la posterior identificación de las proteínas parasitarias asociadas (reguladas y/o reguladoras de actividad) a la endonucleasa TcAP1 de *T. cruzi*. Para ello, se propuso construir dos vectores plasmidiales (*pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*), codificantes de TcAP1 fusionada a los epítopes N-(HA)₃-(FLAG)₃ y N-cMyc, respectivamente. A partir de epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con los mencionados vectores y que sobreexpresan las proteínas de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 y N-cMyc-TcAP1 se propone purificar mediante inmunoprecipitación las endonucleasas TcAP1 recombinantes y sus proteínas asociadas. Posteriormente, estas proteínas se caracterizarán por punto isoeléctrico y masa molecular. Además, se determinará su secuencia aminoácida.

De esta manera, se espera que estos resultados constituyan un primer paso a la generación de instrumentos que permitan acercarse a la determinación de las posibles interacciones proteína-proteína de la endonucleasa AP TcAP1, pudiendo ser éstas de la vía BER o pertenecientes a otras vías de reparación del DNA de *T. cruzi*.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Los vectores de expresión *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1* sirven para expresar las proteínas de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 y N-cMyc-TcAP1, respectivamente, en epimastigotes de *T. cruzi*.

2.2 Objetivo General

Obtención de epimastigotes que expresan las proteínas de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 y N-cMyc-TcAP1, usando los vectores de expresión *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*, respectivamente.

2.3 Objetivos Operacionales

- 1) Construcción de los vectores *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*.
- 2) Selección e identificación de epimastigotes que expresan N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 y N-cMyc-TcAP1.
- 3) Purificación y detección de N-cMyc-TcAP1 recombinante y sus proteínas asociadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Construcción de los vectores *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*

3.1.1 Amplificación de los fragmentos nucleotídicos *(ha)₃-(flag)₃*, *tcap1* y *cmyc-tcap1*

Con el objetivo de generar la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* (que se utilizó posteriormente como vector para la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*), se solicitó la síntesis de un oligonucleótido de DNA de 170 pb, que se diseñó en el siguiente orden: una secuencia de inicio de la traducción (ATG), una secuencia nucleotídica codificante para un epítipo con tres hemaglutininas (HA) y tres FLAG (*(ha)₃-(flag)₃*), y una secuencia nucleotídica de corte para la enzima *XmaI*. Este oligonucleótido se utilizó como DNA molde en reacciones de PCR empleando partidores sentido y antisentido que incorporan sitios de corte para la enzima de restricción *XbaI* (**Tabla 1**). Esta secuencia se clonó posteriormente en el vector de expresión *pTREX* (Vásquez y Levin, 1999).

Tabla 1. Partidores usados para obtener los insertos *(ha)₃-(flag)₃*, *tcap1* y *cmyc-tcap1*

Oligonucleótidos partidores utilizados para amplificar <i>(ha)₃-(flag)₃</i>	
- Sentido:	5' <u>GTCTTGTTC</u> TAGAA <u>TGTACCCATA</u> 3'
- Antisentido:	5' CTCGAGGTCGACGGTATCGAT3'
Oligonucleótidos partidores utilizados para amplificar <i>tcap1</i>	
- Sentido:	5' CCCAAGCTT <u>TATGCCGTCGGGACCTAA</u> 3'
- Antisentido:	5' CCCAAGCTTT <u>CACCTGCGCAGCCACATCT</u> 3'
Oligonucleótidos partidores utilizados para amplificar <i>cmyc-tcap1</i>	
-Sentido:	5' GCTCTAGAATG GAACAAAACTCATCTTCAGAAGAGGATCTGATGCCGTCGGGACCTAAGG 3'
-Antisentido:	5' CCCAAGCTTT <u>CACCTGCGCAGCCACATCTG</u> 3'

Color cian: secuencia codificante del epítipo cMyc

Luego, se generó la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*. Para ello, se amplificó la secuencia nucleotídica codificante de la endonucleasa TcAP1 de *T. cruzi*, la que posteriormente se clonó en el vector de expresión *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*. Se realizaron ensayos de PCR utilizando partidores que incorporan sitios de corte para la enzima de restricción *HindIII* (**Tabla 1**). Como DNA molde se usó la construcción plasmidial *pTREX-tcap1*, generada con anterioridad en nuestro laboratorio (Delgadillo, 2011).

Posteriormente, se obtuvo el vector de expresión *pTREX-cmyc-tcap1*. Para esto, se solicitó la síntesis de un oligonucleótido de 60 pb, el cual se diseñó con el siguiente orden en su secuencia: en su extremo 5' un sitio de corte para la enzima de restricción *XbaI*, seguido por la secuencia nucleotídica codificante del péptido cMyc y, hacia el extremo 3', la secuencia sentido capaz de hibridar con la región nucleotídica inicial de *tcap1*. Este oligonucleótido se usó como partidor sentido. Como partidor antisentido se utilizó un oligonucleótido que incorporó un sitio de corte para la enzima *HindIII* en el extremo 3' de *tcap1* (**Tabla 1**). Como DNA molde se usó la construcción plasmidial *pTREX-tcap1*.

Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 25 μ L, conteniendo: DNA molde (100 ng), 1X amortiguador PCR (2,5 μ L) [Tris-HCl pH 8,4 200 mM; KCl 500 mM], MgCl₂ 50 mM (1,5 μ L), dNTPs 2 mM (2,5 μ L), *Platinum™ Taq DNA polymerase* (1,5 U, Invitrogen) y 32 pmol totales de cada partidor. Las reacciones de PCR siguieron el programa: inicio a 95°C durante 5 min; amplificación: desnaturalización a 95°C durante 30 seg; alineamiento de los insertos *(ha)₃-(flag)₃* a 64°C, *tcap1* a 63°C, *cmyc-tcap1* a 62°C y de las PCR de colonias a 62°C, todos durante 1 min; elongación a 72°C durante 1 min; elongación final a 72°C durante 5 min; conservación a 16°C durante un tiempo indefinido. Para cada PCR se realizaron 35 ciclos de amplificación.

3.1.2 Detección de los amplificados por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos amplificados por PCR (*(ha)₃-(flag)₃*, *tcap1* y *cmyc-tcap1*) se analizaron en geles de agarosa (Winkler) al 1% p/v en amortiguador TBE 1X (5 mL) [Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2,5 mM ajustado a pH 8,3] volumen final 25 mL, teñidos con *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotinum) 1:10000 v/v (2,5 μ L). Se usó como amortiguador de corrida TBE 1X y, como solución de carga glicerol 30% con azul de bromofenol y xilén cianol (ambos al 0,002% p/v). Las muestras se separaron electroforéticamente durante ~40 min a 80 V constantes. Los fragmentos amplificados se detectaron a 254 nm en un transiluminador (UVP, UV trasiluminator).

3.1.3 Purificación de los amplificadores (*ha*)₃-(*flag*)₃, *tcap1* y *myc-tcap1*

Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 1% p/v en TBE 1X pH 8,0 utilizando el kit de cromatografía de afinidad *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega), según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las concentraciones de los insertos se cuantificaron con el kit *Qubit dsDNA Br Assay kit* de *Life Technologies*, según el protocolo del fabricante.

3.1.4 Digestión con enzimas de restricción de amplificadores y de vectores de expresión

Los amplificadores (*ha*)₃-(*flag*)₃ y *myc-tcap1* se sometieron a digestión con enzimas de restricción con el objetivo de clonarlos en el vector de expresión *pTREX*. El amplificador *tcap1* se digirió enzimáticamente para ligarlo al vector de expresión *pTREX*-(*ha*)₃-(*flag*)₃.

Para la digestión enzimática del vector de expresión *pTREX*, así como de los fragmentos amplificados (*ha*)₃-(*flag*)₃ y *myc-tcap1*, se agregaron 10 U de la enzima *XbaI* (Promega) a una solución con 1 µg de DNA del vector de expresión o de los insertos amplificados, en amortiguador de reacción D (Promega) y 5 ng totales de BSA (Promega), en un volumen final de 20 µL. El amplificador *myc-tcap1* y el vector de expresión *pTREX* previamente cortados con *XbaI*, además del vector *pTREX*-(*ha*)₃-(*flag*)₃ y el amplificador *tcap1*, se incubaron con la enzima de restricción *HindIII* (10 U, Promega) en amortiguador de reacción E (Promega) y 5 ng totales de BSA (Promega), en un volumen final de 20 µL.

Cada una de las digestiones se realizó incubando a 37°C durante 16 h, y luego a 80°C durante 20 min para detener la reacción de digestión. Una vez terminadas las digestiones, se comprobaron las linealizaciones de los vectores *pTREX* y *pTREX*-(*ha*)₃-(*flag*)₃ mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en TBE 1X, teñidos con *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain* 1:10000 v/v. A partir de estos geles se purificaron ambos vectores linealizados, utilizando el kit de cromatografía de afinidad *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System*, siguiendo el protocolo del fabricante.

Posteriormente se cuantificó la concentración de DNA con el kit *Qubit dsDNA Br Assay kit* de *Life Technologies*, según el protocolo del fabricante, tanto de los vectores purificados, como de los amplificados digeridos *(ha)₃-(flag)₃*, *myc-tcap1* y *tcap1*.

3.1.5 Clonación de amplificados en vectores de expresión

Previo a realizar la inserción de los amplificados, los vectores de expresión digeridos enzimáticamente *pTREX* (con *XbaI* o *XbaI/HindIII*) y *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* (con *XbaI*) se desfosforilaron utilizando 1 U de fosfatasa alcalina (1 μ L) en amortiguador de reacción [Tris-HCl pH 9,3 50 mM; MgCl₂ 1 mM; ZnCl₂ 0,1 mM y espermidina 1 mM] (5 μ L), en un volumen final de 50 μ L. Las desforilaciones se llevaron a cabo mediante incubaciones a 37°C durante 15 min, seguido de incubaciones a 56°C durante 15 min y finalmente a 80°C durante 20 min para detener de la reacción. Luego, los vectores desfosforilados se purificaron utilizando el kit de cromatografía de afinidad *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System*, según las indicaciones del fabricante.

Los fragmentos amplificados *(ha)₃-(flag)₃* o *myc-tcap1* se ligaron en el vector de expresión *pTREX* cortado y desfosforilado, mientras que el fragmento *tcap1* digerido con *HindIII* se ligó en el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* cortado y desfosforilado. Para todas las ligaciones, se utilizó la enzima DNA ligasa de fago T4 (2U, Promega), amortiguador de reacción (2 μ L) [Tris-HCl 300 mM pH 7,8; MgCl₂ 100 mM; DTT 100 mM y ATP 10 mM] y agua libre de DNasas para completar un volumen final de 20 μ L. Las reacciones se realizaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, los productos de las ligaciones se precipitaron adicionando 1 μ L de glicógeno (20 mg/ml, Invitrogen), 1/10 de volumen de NaOAc 3M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol 100% e incubando durante 2 h a -20°C. Finalmente, los precipitados se resuspendieron por separado en 10 μ L de agua libre de DNasas.

3.1.6 Transformación de bacterias *E. coli* JM109

Las transformaciones de bacterias *E. coli* JM109 con las construcciones *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o *pTREX-myc-tcap1* (obtenidas mediante las ligaciones descritas en 3.1.5) se realizaron mezclando 40 μ L de bacterias *E. coli* JM109 electrocompetentes con 3 μ L de las construcciones plasmidiales

(~1 ng/ μ L), en una cubeta de electroporación de 2 mm de separación entre electrodos (Cell projects). Se aplicó un pulso de 2,5 kV (25 μ F, 200 Ω), se agregaron 700 μ L de medio de cultivo LB líquido y se incubó a 37°C con agitación durante 1 h. En placas de Petri con 130 μ g/mL de ampicilina en medio LB sólido se sembraron volúmenes de 50 μ L o 200 μ L de las bacterias transformadas y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se realizaron repiques de las colonias que crecieron, dejando cuatro copias de cada colonia en una posición de una placa de Petri enumerada. Estas placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

3.1.7 Selección de colonias bacterianas transformadas

Para corroborar la presencia del inserto $(ha)_3-(flag)_3$ en las bacterias transformadas con la construcción $pTREX-(ha)_3-(flag)_3$, se realizaron reacciones de PCR de colonias utilizando el partidor sentido $pTREX-seq$ y el partidor antisentido $pTREX-seq-rev$, ambos complementarios a secuencias nucleotídicas presentes en el vector $pTREX$. Como DNA molde para los ensayos de PCR se utilizó el DNA plasmidial extraído mediante shock térmico desde resuspensiones en agua de cada una de las colonias numeradas presentes en los repiques. La presencia del inserto $(ha)_3-(flag)_3$ en el vector $pTREX$ se evidenció por la amplificación de un fragmento de ~400 pb, mientras la amplificación de un fragmento de ~200 pb determinó la ausencia del inserto en la construcción.

Por otra parte, para comprobar la inserción de $tcap1$ y $cmc-tcap1$ en las construcciones $pTREX-(ha)_3-(flag)_3-tcap1$ y $pTREX-cmc-tcap1$, respectivamente, se realizaron ensayos de PCR de colonia con los mismos partidores usados para amplificar los insertos de $tcap1$ o $cmc-tcap1$ (señalados en 3.1.1 y en **Tabla 1**). Como DNA molde para los ensayos de PCR se utilizó el DNA plasmidial extraído mediante shock térmico desde resuspensiones en agua de cada una de las colonias numeradas en los repiques.

Las reacciones de PCR de colonias se efectuaron a un volumen final de 12,5 μ L, con una mezcla: 1X amortiguador de PCR (1,25 μ L), dNTPs 2 mM (1,25 μ L), partidores sentido y antisentido a 10 pmoles de cada uno, $MgCl_2$ 50 mM (0,75 μ L), 0,75 U *PlatinumTM Taq DNA polymerase* (Invitrogen) y agua libre de nucleasas para completar 7,5 μ L. La diferencia de volumen se completó añadiendo 5 μ L del DNA plasmidial extraído. Se

detalla el protocolo de cada reacción de PCR de colonias en la **Tabla 2**. Las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en TBE 1X pH 8,0, teñidos con *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain*.

Tabla 2. Detalle de los partidores usados en las PCR de colonias

PCR colonias	Partidor	Secuencia	Tm (°C)
<i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃</i>	Sentido	5' -GCAGCGGATTCACTAAGAAAC-3'	62
	Antisentido	5' -CTCGAGGTCGACGGTATCGAT-3'	64
<i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i>	Sentido	5' -CCCAAGCTTATGCCGTCGGGACCTAA-3'	62
	Antisentido	5' -CCCAAGCTTTCACCTGCGCAGCCA-3'	61
<i>pTREX-cmyc-tcap1</i>	Sentido	5' -CGTCGCCTAAGTGATTCTTTG-3'	62
	Antisentido	5' -CCCAAGCTTTCACCTGCGCAGCCACATCTG-3'	62

3.1.8 Verificación por secuenciación de la obtención de las construcciones esperadas

La correcta inserción y marco de lectura de los amplificados en cada una de las construcciones generadas (*pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*) se verificaron purificando el DNA plasmidial desde las colonias positivas de acuerdo a la técnica de PCR de colonia, utilizando el kit *QIAprep Spin Miniprep®* (QIAGEN), según instrucciones del fabricante. Los plasmidios purificados se enviaron a secuenciación automática de DNA en la Facultad de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se usó el partidor *pTREX-seq* para las secuenciaciones (**Tabla 3**). Las secuencias obtenidas desde las construcciones se analizaron mediante alineamientos con la secuencia esperada, empleando el programa *Clustal Omega* de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Tabla 3. Detalle del partidor usados en secuenciación automática de DNA

Construcción	Partidor	Secuencia	Tm (°C)
<i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃</i>	<i>pTREX seq</i>	5' -GCAGCGGATTCACTAAGAAAC-3'	62
<i>pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1</i>			
<i>pTREX-cmyc-tcap1</i>			

3.2 Obtención de epimastigotes que expresen N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 y N-cMyc-TcAP1

3.2.1 Cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*

Los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Y se realizaron en medio LIT [*Liver Infusion Tryptose*: triptosa 5 g/L, extracto de hígado 5 g/L, NaCl 68 mM; KCl 5,3 mM, Na₂HPO₄ 22mM, glucosa 11,1 mM] (Camargo, 1964) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB), 20 µg/ml hemina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 28°C.

3.2.2 Transfección y selección de epimastigotes de *T. cruzi* con las construcciones *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o *pTREX-cmyc-tcap1*

Cultivos de epimastigotes de la cepa Y en fase exponencial de crecimiento se transfectaron con los vectores *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o *pTREX-cmyc-tcap1*. Para ello, se tomaron alícuotas de 5x10⁷ parásitos/mL (1 mL) (contados en cámara de Neubauer, por contraste de fases) y se lavaron en amortiguador fosfato salino (1 mL, PBS pH 7,2) estéril. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y a cada sedimento se agregaron 50-100 µg del plasmidio *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o *pTREX-cmyc-tcap1*. Luego, se completó a un volumen de 400 µL con amortiguador de electroporación [KCl 120 mM, CaCl₂ 0,15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, HEPES 25 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,6]. Las transfecciones se realizaron mediante electroporación, aplicando dos pulsos de 300V constantes (500 µF), separados por un intervalo de 2 min en hielo.

Los parásitos transfectados se transfirieron a medio LIT suplementado con 20% SFB (3 mL) y se incubaron durante toda la noche a 28°C. Transcurrido este tiempo, se agregaron al cultivo 750 µg del antibiótico G-418 (250 µg/mL). Esta concentración de antibiótico se mantuvo durante 2 semanas y luego se incrementó a 500 µg/ml (volumen del cultivo 3 mL). El proceso de selección se llevó a cabo durante 8 semanas. Una vez por semana, se cambió el medio de cultivo y dos veces por semana se añadió antibiótico G-418. La expresión de las proteínas N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 o N-cMyc-TcAP1 se confirmó mediante ensayos de *Western blot*, como se detalla a continuación.

3.2.3 Detección de la expresión de las proteínas N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 o N-cMyc-TcAP1 en epimastigotes transfectados

La expresión de las proteínas recombinantes N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 o N-cMyc-TcAP1 en epimastigotes transfectados y seleccionados se comprobó mediante ensayos de *Western blot*. Para ello, se homogeneizaron 1×10^8 epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o *pTREX-cmyc-tcap1* en amortiguador de lisis [HEPES-KOH 25 mM pH 7,8; KCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; sacarosa 250 mM; glicerol 10%; DTT 1 mM; cóctel de inhibidores de proteasas (1 tableta) (S8830-20TAB, Sigma)] (40 µL). Se añadió amortiguador de carga 1X [β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,002%] (10 µL) y se aplicó un shock térmico en un baño termoregulado a ~100°C. Las proteínas del lisado se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% (separador) [Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 10%; acrilamida-bisacrilamida (39:1) 10%, PSA 10% 200 µL y TEMED 21 µL] (5 mL), usando un gel concentrador al 4% [Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; acrilamida-bisacrilamida (39:1); PSA 10% 70 µL y TEMED 10 µL] (2,5 mL). Posteriormente, se realizaron electrotransferencias húmedas usando membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en amortiguador de transferencia [Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% v/v]. Las membranas resultantes se bloquearon con BSA 5% p/v en PBS-Tween 0,05% durante toda la noche a 4°C. Luego, las membranas de nitrocelulosa derivadas de epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-FLAG (OriGen) en una dilución de 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05% o con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-HA (Thermo Scientific) en una dilución de 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05%. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución de 1:15000 v/v en PBS-Tween 0,05% durante una hora a temperatura ambiente.

Por otra parte, las membranas de nitrocelulosa derivadas de epimastigotes transfectados con la construcción *pTREX-cmyc-tcap1* se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-cMyc (Sigma) en una dilución 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05% y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución de 1:15000 v/v en PBS-Tween 0,05%

durante una hora a temperatura ambiente. Como control de carga se midieron los niveles de producción de α -tubulina, empleando un anticuerpo monoclonal específico de ratón (1:14000 en PBS-Tween 0,05%, Sigma).

El revelado en placas radiográficas se logró mediante quimioluminiscencia utilizando el kit *SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate* (Thermo Scientific) o se analizaron las membranas con el Scanner para membranas de *Western blot* de quimioluminiscencia de la marca LI-COR, usando el mismo kit quimioluminiscente.

3.3 Purificación e identificación de N-cMyc-TcAP1 recombinante y sus proteínas asociadas

3.3.1 Inmunoprecipitación de N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas

La purificación de la proteína N-cMyc-TcAP1 junto a sus posibles proteínas asociadas, se realizó con el kit *Anti-cMyc Immunoprecipitation I0020-KT* (Sigma). Para tales efectos, 5×10^6 epimastigotes transfectados que expresan la proteína N-cMyc-TcAP1 o 5×10^6 epimastigotes control (sin transfectar) se centrifugaron y resuspendieron en amortiguador de lisis [*CellLytic M Cell Lysis reagent* 500 μ L, PMSF (200X) 2,5 μ L, IP25 (25X) 20 μ L, ortovanadato (50X) 10 μ L]. Luego de realizar una agitación durante 2 h a 4°C en vortex, los lisados se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos (450 μ L) fueron incubados de manera independiente con 30 μ L de la resina *cMyc-agarose* y 120 μ L de amortiguador IP, durante toda la noche (en una *spin column* provista por el fabricante).

Cada columna se lavó 5 veces con amortiguador de lavado (700 μ L) [Tris 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; inhibidores PMSF-isopropanol 200X (50 μ L) e IP40 250 μ L] y las proteínas retenidas se eluyeron con un amortiguador de elución suave (100 μ L) [Tris-HCl 50 mM pH 8,0; SDS 0,2%; Tween-20 0,1%].

La concentración de las proteínas obtenidas se cuantificó utilizando el kit *Pierce BCA protein assay kit* de Thermo Scientific, según las indicaciones del fabricante. La presencia de la proteína N-cMyc-TcAP1 en los eluidos se evaluó mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-cMyc

(Sigma) en una dilución 1:2000 v/v en PBS-Tween 0,05% y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson) en una dilución de 1:15000 v/v en PBS-Tween 0,05%.

3.3.2 Separación electroforética bidimensional de cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas

Para detectar las proteínas contenidas en las eluciones derivadas de las inmunoprecipitaciones de epimastigotes transfectados que expresan la proteína N-cMyc-TcAP1 y epimastigotes control sin transfectar, se realizaron separaciones electroforéticas bidimensionales. Para ello, las proteínas obtenidas desde los eluidos de cada inmunoprecipitación (N-cMyc-TcAP1 y control) se precipitaron con TCA 20% y se resuspendieron con 125 μ L de amortiguador 2D [urea 7 M; tiourea 2 M, CHAPS 4%; DTT 100 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0; inhibidores de proteasas 1X, volumen de 10 mL]. A cada muestra se le añadieron 3 μ L de *Bio-Lyte 3/10 Anfolyte* (Bio-Rad). Para el isoelectroenfoque (primera dimensión) de las proteínas resuspendidas, se utilizaron tiras *ReadyStrip IPG strips* de 7 cm, con rangos de pH de 3-10. Utilizando una celda de IEF Bio-Rad PROTEAN IEF Cell, se aplicó el siguiente programa: rehidratación pasiva por 10 h, y luego a 150 V durante 1 h, 300 V durante 2 h, 600 V durante 1 h y 3500 V durante 10,5 h (Magalhaes *et al.*, 2008); en total 24,5 h y 38100 V. Finalizada la corrida, las tiras se incubaron durante 10 min en amortiguador de equilibrio 1 [Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2%; DTT 1%, glicerol 20%, en 10 mL finales] y luego, durante 10 min en amortiguador de equilibrio 2 [Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2%; iodoacetamida 4%, glicerol 20%, en 10 mL finales].

A continuación, se realizaron las separaciones electroforéticas de las proteínas presentes en las tiras provenientes del isoelectroenfoque, realizando SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 10% (segunda dimensión) los que se sometieron durante 2 h a 100 V constantes. Posteriormente, para detectar las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1, así como la propia N-cMyc-TcAP1, los geles se incubaron toda la noche en amortiguador fijador [ácido acético glacial 30 mL; etanol 125 mL; formaldehido 125 μ L]. Los geles fijados se lavaron 3 veces con etanol 50% durante 5, 10 y 15 min y se incubaron durante 5 seg con amortiguador de tiosulfato 0,02% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) (5 mL). Luego, se

lavaron con agua y se incubaron durante 30 min con amortiguador de nitrato de plata [nitrato de plata 2,9 mM; solución tiosulfato 0,02%; formaldehído 0,0005%, agua para completar 250 mL].

Finalmente, se realizaron incubaciones de ~5 min con amortiguador revelador [carbonato de sodio 70 mM; solución tiosulfato 0,02%; formaldehído 0,0005%, 250 mL finales]. La reacción se detuvo incubando los geles en solución *Stop* [ácido acético 30 mL, Tris 0,04%, 250 mL finales].

3.3.3 Espectrometría de masa de las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1

Los *spots* de proteínas diferenciales se escogieron comparando los resultados de la separación electroforética bidimensional de las inmunoprecipitaciones de proteínas presentes en epimastigotes control sin transfectar con la de epimastigotes transfectados con el vector *pTREX-cmyc-tcap1*. Estos *spots* se extrajeron desde el gel de la electroforesis bidimensional de la elución de N-cMyc-TcAP1 y se enviaron a analizar mediante espectrometría de masa a la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur en Montevideo, Uruguay.

IV. RESULTADOS

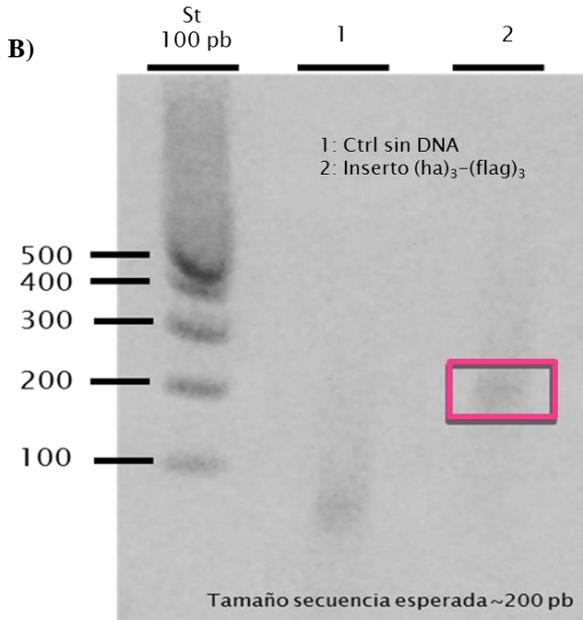
4.1 Construcción de los vectores *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*

4.1.1 Construcción del vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*

Con el objetivo de insertar la secuencia nucleotídica codificante de un epítipo compuesto de tres hemaglutininas (HA) y tres FLAG ((HA)₃-(FLAG)₃) en el vector de expresión *pTREX* de *T. cruzi* (Vásquez y Levin, 1999), se solicitó la síntesis de un oligonucleótido de DNA de 170 pb (caracterizado en la sección 3.1.1) (**Figura 1A**). Este oligonucleótido se utilizó como DNA molde en reacciones de PCR, empleando partidores sentido y antisentido que adicionaron sitios de corte para la enzima de restricción *Xba*I. En la **Figura 1B** se muestra la separación electroforética de los amplificadores del fragmento *(ha)₃-(flag)₃* en un gel de agarosa 1% p/v en TBE 1X, teñido con *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain*. La presencia de un amplificado cercano a 200 pb (carril 3) concuerda con el tamaño esperado. El fragmento *(ha)₃-(flag)₃* amplificado por PCR se purificó desde geles de agarosa, se sometió a digestión enzimática con *Xba*I y se insertó en el vector de expresión *pTREX*, previamente digerido con *Xba*I y desfosforilado. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* JM109.

La selección de clones positivos se realizó mediante reacciones de PCR de colonias, utilizando el partidor sentido *pTREX-seq* y el partidor antisentido *pTREX-seq-rev*, ambos complementarios a secuencias nucleotídicas presentes únicamente en el vector *pTREX* (amplificado esperado de ~400 pb en presencia del inserto y de ~200 pb en ausencia del inserto). Plásmidos purificados desde tres colonias positivas para la reacción de PCR (**Figura 1C**, colonias 2, 3 y 5) se enviaron a secuenciación automática de DNA para verificar su correcta orientación y marco de lectura. En la **Figura 2** se presenta la secuencia nucleotídica obtenida para uno de los clones secuenciados, alineada con la secuencia nucleotídica esperada. En suma, se obtuvo la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*.

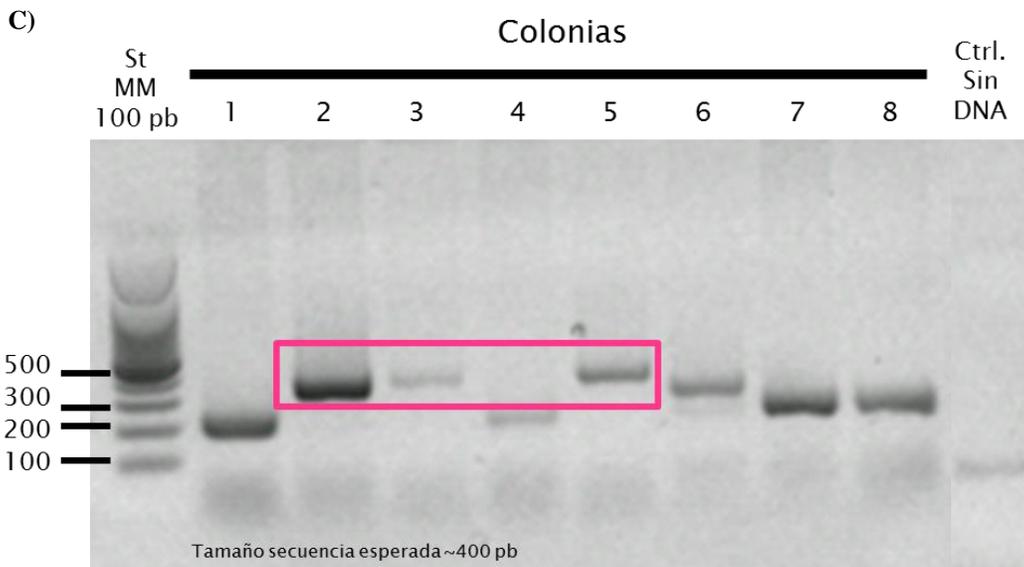
A) 5' TG **TCTAGA**ATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTA
 CCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGATTCAAAGGATGACGATGACAAGGATTCAAAGGATGACGATGACA
 AGGATTACAAGGATGACGATGACAAG **CCCGGG**AA**TCTAGA**GT 3'



Partidor	Secuencia	T _m (°C)
Sentido	5' -GCTCTAGAATGTACCCATACGACGT-3'	64
Antisentido	5' -GCTCTAGAAAGGGCCGAAACAGTAGCAGT-3'	64

Figura 1. Generación del vector pTREX-(ha)₃-(flag)₃

A) Oligonucleótido molde que presenta la secuencia nucleotídica codificante de (HA)₃-(FLAG)₃. En amarillo secuencia codificante de (HA)₃. En verde, secuencia codificante de (FLAG)₃. En celeste se destaca el sitio de corte para *Xba*I y en rosado el sitio de corte para *Xma*I. B) Separación electroforética del amplificado por PCR (ha)₃-(flag)₃ de ~200 pb. C) Separación electroforética confirmatoria de la presencia del inserto (ha)₃-(flag)₃ en la construcción pTREX-(ha)₃-(flag)₃ extraída desde colonias de *E. coli* transformadas. Amplificados intermedios corresponden a distancia entre los partidores del vector. B)-C) Geles de agarosa, se prepararon al 1% p/v en TBE 1X, teñido con *GelRed*. Las imágenes se contrastaron y los colores se invirtieron. (Se detallan en tablas los partidores sentido y antisentido usados).



Partidor	Secuencia	T _m (°C)
pTREXseq	5' -GCTCTAGAATGTACCCATACGACGT-3'	62
pTREXseq-rev	5' -GCTCTAGAAAGGGCCGAAACAGTAGCAGT-3'	62

```

ptrex      TTTTTTCTTTTCCAACCTTCTTTTATGATGTCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTGGCTCTATAAG
C5         TTTTTTCTTTTCCAACCTTCTTTTATGATGTCTTTTCTTTTT--TTTTTTTGGCTCTATAAG
          *****

ptrex      TTGTCTTGTCTAGAATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCATACGACGTCC
C5         TTGTCTTGTCTAGAATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCATACGACGTCC
          *****

ptrex      CAGACTACGCTTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGATTACAAGGATGACGATGACA
C5         CAGACTACGCTTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGATTACAAGGATGACGATGACA
          *****

ptrex      AGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGATTACAAGGATGACGATGACAAGCCCGGAATC
C5         AGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGATTACAAGGATGACGATGACAAGCCCGGAATC
          *****

ptrex      TAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGCCATTTACGACTCCAAGGC
C5         TAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGCCATTTACGACTCCAAGGC
          *****

```

 *(ha)₃-(flag)₃ (170 pb)*

Figura 2. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la construcción *pTRES-(ha)₃-(flag)₃* obtenida mediante secuenciación automática, con la secuencia nucleotídica esperada.

C5: secuencia nucleotídica de la construcción *pTRES-(ha)₃-(flag)₃*, purificada a partir de un cultivo de la colonia bacteriana Nro. 5.

ptrex: secuencia nucleotídica esperada para la construcción *pTRES-(ha)₃-(flag)₃*.

En verde se muestra la secuencia nucleotídica codificante del epítipo (HA)₃-(FLAG)₃. El alineamiento se realizó con el programa de *Multiple Sequence Alignment* Clustal Omega desarrollada por el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

Posteriormente, se amplificó la secuencia nucleotídica codificante de la endonucleasa TcAP1 mediante PCR, utilizando como DNA molde la construcción plasmidial *pTREX-tcap1* generada con anterioridad (Delgadillo, 2011). Los partidores empleados incluyeron sitios de corte para la enzima de restricción *HindIII* (**Figura 3A**).

En la **Figura 3B** se muestra la separación electroforética de los amplificados del fragmento de DNA codificantes de la endonucleasa TcAP1 (tamaño del amplificado ~1200 pb) en un gel de agarosa 1% p/v en TBE 1X, teñido con *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain*. Los amplificados se purificaron desde geles de agarosa, se digirieron con *HindIII* y se insertaron en el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, previamente digerido con *HindIII*.

El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* JM109. Se realizó una selección de clones positivos mediante ensayos de PCR de colonias, obteniéndose una colonia positiva (**Figura 3C**, colonia 5). La construcción purificada desde la colonia positiva se envió a secuenciación automática de DNA para verificar su correcta orientación y marco de lectura. En la **Figura 4** se muestra la secuencia nucleotídica obtenida para el clon secuenciado, alineada con la secuencia nucleotídica esperada. En suma, se obtuvo la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*.

4.1.2 Construcción del vector *pTREX-cmyc-tcap1*

Para generar el vector de expresión *pTREX-cmyc-tcap1*, se solicitó la síntesis de un oligonucleótido de 60 pb (caracterizado en la sección 3.1.2). Este oligonucleótido, que presenta un sitio de corte para la enzima *XbaI*, se empleó como partidador sentido en ensayos de PCR destinados a amplificar el fragmento *cmyc-tcap1*. El partidador antisentido utilizado incorporó un sitio de corte para la enzima *HindIII*. Como DNA molde se utilizó el plásmido *pTREX-tcap1* generado con anterioridad (Delgadillo, 2011). En la **Figura 5A**, se muestra la separación electroforética de los amplificados del fragmento de DNA codificante de la endonucleasa AP TcAP1 (tamaño del amplificado ~1200 pb) en un gel de agarosa 1% p/v en TBE 1X, teñido con *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain*. Los amplificados se purificaron desde geles de agarosa y se clonaron en el vector de expresión *pTREX*, previamente digerido con *XbaI-HindIII* y desfosforilado.

A) 5' CCCAAGCTTATGCGGTGCGGACCTAAGGAACAGAAAGCCGGTTGCGGGCGGCGGGGGGAAGCGCACACGCAGTCGATCCCCGT
 CGGCCACATCGCCGAAGAAACCCGCCACGCGTTCACGCGAATTTCGTACGCCGACACCACCTTCCCCGTCGCTAAATTCGCGGGTGGG
 GAGGGCAGATCTCCCAATCGTCCCCTCGCGGCCGATTGACCGCCCCGCCACCGTCGGACGATGACACGAGGAAGACGGAGAAGGATAT
 TTGGAGCCCAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCCGAACAGCGCGGAAGGATTTCGACAGCAAACATATGCTGAAATTCATCAGCTGGAATGTTG
 CTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGACCAGGCGATCCAACGACTGCTCGAGGAGGAGGGGCGGACGCGTTGTGTCTGCAGGAA
 ACGAAGCTGAACCCGGACGATCCACAAAATGAAAAGTTGGGCGAGGTGCCAGGGTACCGCTTCGTGACACGCTCTGCCGCGCAAAGAA
 GGGGTACTCTGGCACACGGACGTACATCAAAAATACGGCGCCCGGGAGTGGAAAGACGGTCAACCGTAAAGGGATTTGACACCTTGAAAA
 GCCCGCAGGATGTCGGTCATAGTGAAGGGGATGAGGAGGGGACGCGTTTCACCACGTACTTTGGGACGCAAGGAAAGGGCAGCGAGACT
 TTTGCCCTGGCGCTGGTGAATACATACATCCCCAACAGTGGGATGTCGTTGGAGCGCCTCCCGTACCCTGCCAGAAGTTTGATTTGCG
 GATCCCGCAACATTTATGCACCTTGGGACGCTCTGCAACCACGACAAGGAGGAGGGCGACGCCCGTCACTCGCAGGTTTCATCTGGG
 CAGGCGACCTGAATGTCGCCGAGCGTGACTACGACCGTTACTTTGCCGGCTCCTACAAGGGGATGCAGAAGTGCAGCGGCTTCACCCCG
 GAGGAACGCGCCTCGTTCCGTGAAACATTCGGGTGGCAAAATGCGGTGGACACCTTCGTCGCTGTACCCAAAGGCGGCACCCGTTTA
 CACATTTTGGTCCGCGCGCATCAACGGCAGGGCCCGGGCCCTCGGTTGGCGGCTGGACTACTTCGTGGTCTCCGCGCGCTTGGCCCGCC
 ACGTCGTGGACTGCTTACGATGCCCCACGTGATGGGAGTGATCACTGCCCGTGCAGATGTGGCTGCGCAGGTGAAGCTTGGG3'

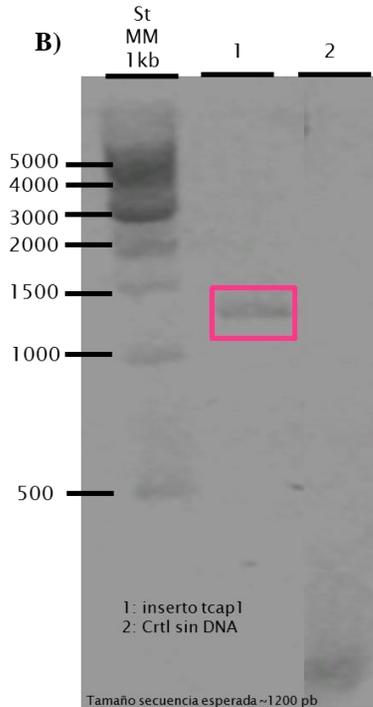
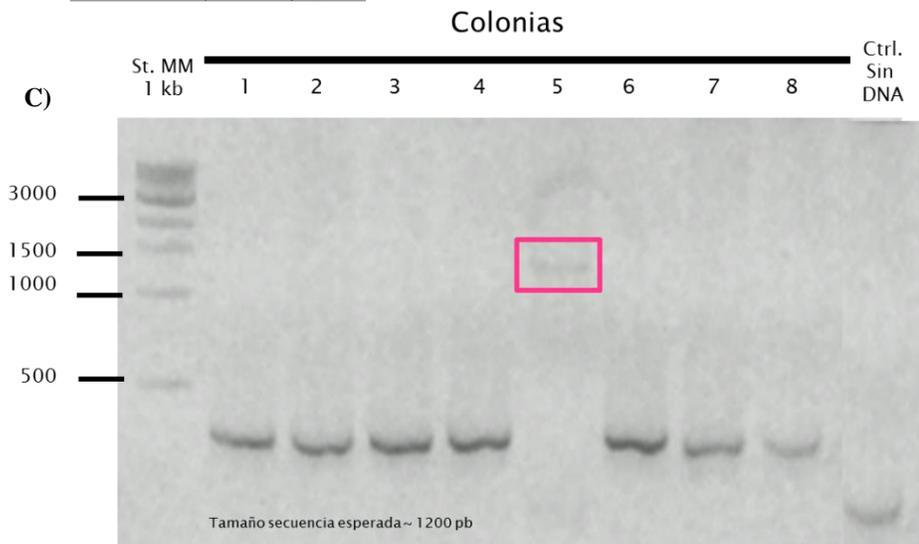


Figura 3. Generación del vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*.

A) Secuencia nucleotídica codificante de la endonucleasa APE TcAP1 de *T. cruzi*. En rojo: triplete ATG y TGA de inicio y término de la traducción, respectivamente. En amarillo se destaca los sitios de corte para la enzima de restricción de *Hind*III. En azul secuencia codificante de TcAP1. **B)** Separación electroforética del amplificado *tcap1* (~1200 pb) obtenido mediante PCR. **C)** Separación electroforética confirmatoria de la presencia del inserto *tcap1* en la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* purificada desde colonias de *E. coli* transformadas. Solo se obtuvo la colonia número 5 como positiva (~1400 pb). **B)** y **C)** Los geles de agarosa se prepararon al 1% p/v en TBE 1X, teñido con *GelRed*. Las imágenes se contrastaron y los colores se invirtieron. Se detallan en las tablas los partidores sentido y antisenido utilizados.

Partidor	Secuencia	Tm (°C)
Sentido	5' -ccaagcttatgcccgtcgggacctaa-3'	61
Antisenido	5' -ccaagctttcacctgcgccacacatct-3'	61



Partidor	Secuencia	Tm (°C)
pTREXseq	5' -CGTCGCCTAAGTGATCTTTG-3'	62
pTcAp1 rev	5' -CCCAAGCTTTCACCTGCGCAGCCACATCT-3'	62

```

ptrex      ttgtcttgtctagaATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCATACGACGTCC
c5         TTGTCTTGTCTAGAATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTACCCATACGACGTCC
*****

ptrex      CAGACTACGCTTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGATTACAAGGATGACGATGACA
c5         CAGACTACGCTTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGATTACAAGGATGACGATGACA
*****

ptrex      AGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGATTACAAGGATGACGATGACAAGCCCGGGAATC
c5         AGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGATTACAAGGATGACGATGACAAGCCCGGGAATC
*****

ptrex      TAGAattcgatatcaAGCCTATGCCGTCGGGACCTAAGGAACAGAAGCCGGTTGCGGGCGG
c5         TAGAATTTCGATATCAAGCTTATGCCGTCGGGACCTAAGGAACAGAAGCCGGTTGCGGGCGG
*****

ptrex      GCGGGGGGAAGCGCACACGCAGTCGATCCCCGTCGGCCACACCCGCCAAGAAACCCGCCA
c5         GCGGGGGGAAGCGCACACGCAGTCGATCCCCGTCGGCCACACCCGCCAAGAAACCCGCCA
*****

ptrex      CGCGTTCCACGCGAATTCGTACGCCGACACCACCTTCCCACTCGTAAATTCTGCGGGGTG
c5         CGCGTTCCACGCGAATTCGTACGCCGACACCACCTTCCCACTCGTAAATTCTGCGGGGTG
*****

ptrex      CGGAGGCGATATCTCCCACTCGTCCCCTCACCGCCGATTGCCCCGCCCGCCACCGTCGG
c5         CGGAGGCGATATCTCCCACTCGTCCCCTCACCGCCGATTGCCCCGCCCGCCACCGTCGG
*****

ptrex      GCGATGACACGAGGAAGACGCGAGAAGGATATTTGGAGCCAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCC
c5         GCGATGACACGAGGAAGACGCGAGAAGGATATTTGGAGCCAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCC
*****

ptrex      GAACAGCGGCGAAGGATTTTCGACAGCAAACAGATGCTGAAATTCATCACGTGGAATGTTG
c5         GAACAGCGGCGAAGGATTTTCGACAGCAAACAGATGCTGAAATTCATCACGTGGAATGTTG
*****

ptrex      CTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGGCCAGGCGATCCAACGACTGCTCGAGGAGG
c5         CTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCGGAAGGATGGCCAGGCGATCCAACGACTGCTCGAGGAGG
*****

ptrex      AGAGGCCAGACGCGTTGTGTCTGCAGGAAACGAAGCTGAACCCGGACGATCCACAAAATG
c5         AGAGGCCAGACGCGTTGTGTCTGCAGGAAACGAAGCTGAACCCGGACGATCCACAAAATG
*****

ptrex      GAAAGTTGGGCGAGGTGCCAGGGTATGCTTCGTCGACCACGTCTGCCGCGCAAAGAAGG
c5         GAAAGTTGGGCGAGGTGCCAGGGTATGCTTCGTCGACCACGTCTGCCGCGCAAAGAAGG
*****

ptrex      GGTACTCTGGCACACG-GACGTACATCAAAAATACGGCGGCC-ACGGAGTGAAG--ACG
c5         GGTACTCTGGCACACGGGACGTACATCAAAAATACGGCGGCCACGGAGTGAAGAGACGG
*****

```

 *(ha)₃-(flag)₃* (170 pb)
 *tcap1* (1200 pb)

Figura 4. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la construcción *pTRES-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, obtenida mediante secuenciación automática, con la secuencia nucleotídica esperada.

C5: secuencia nucleotídica de la construcción *pTRES-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, purificada a partir de un cultivo de la colonia bacteriana Nro. 5. **ptrex:** secuencia nucleotídica esperada para la construcción *pTRES-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*. En verde se muestra la secuencia nucleotídica codificante del epítipo (HA)₃-(FLAG)₃. En amarillo se muestra la secuencia nucleotídica codificante de TcAP1. El alineamiento se realizó con el programa de *Multiple Sequence Alignment* Clustal Omega desarrollada por el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

El producto de la ligación se usó para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* JM109. Se detectaron 5 clones positivos a partir de una reacción de PCR de colonias (**Figura 5B**, carriles 6, 7, 8, 15 y 16). Las construcciones purificadas desde las colonias positivas se enviaron a secuenciación automática de DNA para verificar su correcto marco de lectura. En la **Figura 6**, se muestra la secuencia nucleotídica obtenida para uno de los clones, alineada con la secuencia nucleotídica esperada. En conclusión, se obtuvo la construcción *pTREX-cmyc-tcap1*.

4.2 Obtención de epimastigotes transfectantes

Mediante electroporación, se transfectaron epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) en fase exponencial de crecimiento con las construcciones *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o *pTREX-cmyc-tcap1*. Posteriormente, los transfectantes se cultivaron y seleccionaron con el antibiótico G-418.

4.2.1 Expresión de la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 en epimastigotes transfectados

La comprobación de la expresión de la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 (polipéptido esperado de 463 aminoácidos y masa molecular estimada de 45 kDa) se evaluó mediante ensayos de *Western blot* sobre homogeneizados de proteínas totales de parásitos controles (transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* y sin transfectar) y parásitos transfectados con el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*. Para tales efectos, se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-FLAG y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano. Como control positivo, se cargó una proteína de 130 kDa con el epítipo FLAG. En la **Figura 7** se muestra el resultado de estos experimentos. El anticuerpo primario anti-FLAG solo reconoció bandas inespecíficas similares, tanto en el homogeneizado de proteínas totales de parásitos control sin transfectar (**Figura 7A**, carril 1), parásitos transfectados con el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* (**Figura 7A**, carril 3), así como en el homogeneizado de proteínas totales de parásitos transfectados con la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* (**Figura 7A**, carril 4).

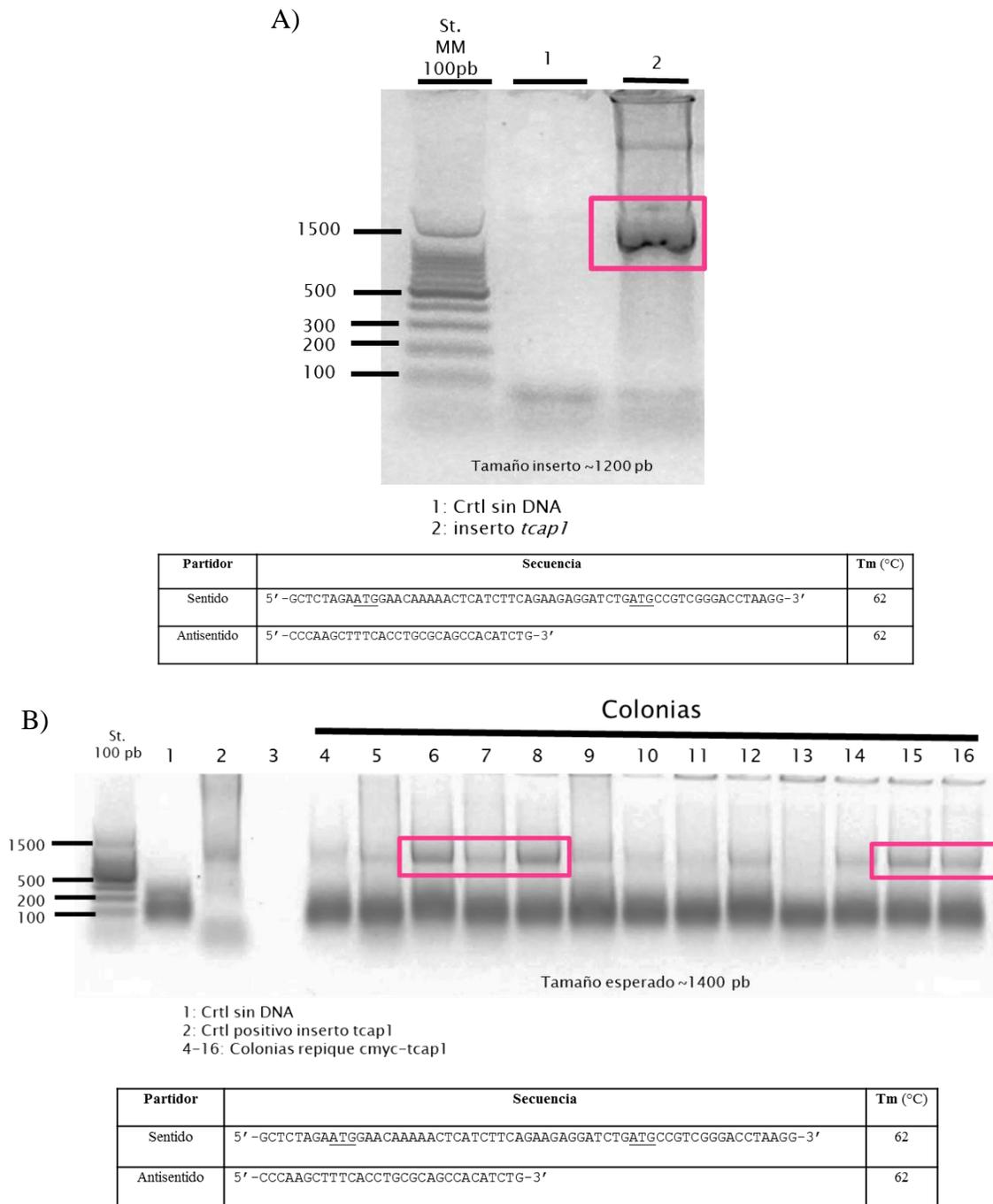


Figura 5. Generación del vector *pTREX-cmyc-tcap1*.

A) Separación electroforética del amplificado *tcap1* (~1200 pb) obtenido mediante PCR. **B)** Separación electroforética confirmatoria de la presencia del inserto *tcap1* en la construcción *pTREX-cmyc-tcap1* purificada desde colonias de *E. coli* transformadas. Se seleccionaron 5 colonias positivas (6, 7, 8, 15 y 16) al realizar la reacción de PCR de colonias. Como control positivo del PCR se usó el plasmidio *pTREX-tcap1* como DNA molde. **A)** y **B)** Los geles de agarosa se prepararon al 1% p/v en TBE 1X, teñido con *GelRed*. Las imágenes se contrastaron y los colores se invirtieron. Se detallan en tablas los partidores sentido y antisentido utilizados.

```

c6      TTTTTTTTTTTGCTCTATCTAGAAATGGAACAAAACTCATCTTCAGAAGAGGATCTGAT 180
ptrex   TTT-TTTTTTTTGGCTCTATCTAGAAATGGAACAAAACTCATCTTCAGAAGAGGATCTGAT 180
        *****_*****

c6      GCCGTCGGGACCTAAGGAACAGAAGCCGGTTGCGGGGGGGGGGAAGCGCACACGCAG 240
ptrex   GCCGTCGGGACCTAAGGAACAGAAGCCGGTTGCGGGGGGGGGGAAGCGCACACGCAG 240
        *****

c6      TCGATCCCCGTCGGCCACACCGCCGAAGAAACCCGCCACGCGTTCCACGCGAATTCGTAC 300
ptrex   TCGATCCCCGTCGGCCACACCGCCGAAGAAACCCGCCACGCGTTCCACGCGAATTCGTAC 300
        *****

c6      GCCGACACCACCTTCCCACTCGCTAAATCTGCGGGTGCGGAGGCGATATCTCCCACTCG 360
ptrex   GCCGACACCACCTTCCCACTCGCTAAATCTGCGGGTGCGGAGGCGATATCTCCCACTCG 360
        *****

c6      TCCCTCACCGCCGATATGCCCCGCCCGCCACCGTCGGGCGATGACACGAGGAAGACGGA 420
ptrex   TCCCTCACCGCCGATATGCCCCGCCCGCCACCGTCGGGCGATGACACGAGGAAGACGGA 420
        *****

c6      GAAGGATATTTGGAGCCAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCCGAACAGCGCGAAGGATTTCGA 480
ptrex   GAAGGATATTTGGAGCCAAGTGGAGCCCTTCCAGCGCCGAACAGCGCGAAGGATTTCGA 480
        *****

c6      CAGCAAACAGATGCTGAAATTCATCACGTGGAATGTTGCTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCG 540
ptrex   CAGCAAACAGATGCTGAAATTCATCACGTGGAATGTTGCTGGCCTGCGTGGGCTGCTGCG 540
        *****

c6      GAAGGATGGCCAGGCGATCCAACGACTGCTCGAGGAGGAGAGGCCAGACGCGTTGTGTCT 600
ptrex   GAAGGATGGCCAGGCGATCCAACGACTGCTCGAGGAGGAGAGGCCAGACGCGTTGTGTCT 600
        *****

c6      GCAGGAAACGAAGCTGAACCCGGACGATCCACAAAATGGAAGTTGGGCGAGGTGCCAGG 660
ptrex   GCAGGAAACGAAGCTGAACCCGGACGATCCACAAAATGGAAGTTGGGCGAGGTGCCAGG 660
        *****

```

■ *cmc* (~30 pb)
■ *tcap1* (~1200 pb)

Figura 6. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la construcción *pTREX-cmyc-tcap1*, obtenida mediante secuenciación automática, con la secuencia nucleotídica esperada.

C6: secuencia nucleotídica de la construcción *pTREX-cmyc-tcap1*, purificada a partir de un cultivo de la colonia bacteriana Nro. 6. **ptrex:** secuencia nucleotídica esperada para la construcción *pTREX-cmyc-tcap1*. En rojo se destacan los codones de inicio de la traducción. En celeste se muestra la secuencia nucleotídica codificante del epítipo cMyc. En amarillo se muestra la secuencia nucleotídica codificante de TcAP1. El alineamiento se realizó con el programa de *Multiple Sequence Alignment Clustal Omega* desarrollada por el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

La especificidad del ensayo de *Western blot* se corroboró por la detección de una banda de masa esperada en el carril cargado con la proteína control de 130 kDa que incluye el epítipo FLAG (**Figura 7A**, carril 2). En este último carril no se detectó la banda de 45 kDa, que correspondería a la proteína esperada (N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1).

Resultados similares se obtuvieron al realizar un segundo ensayo de *Western blot*, utilizando en esta oportunidad un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-HA y, un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (**Figura 7B**). Al igual que en el resultado del *Western blot* anterior, tampoco se detectó una banda cercana a los 45 kDa, correspondiente a la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 en el carril cargado con el homogeneizado de proteínas totales de parásitos transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* (**Figura 7B**, carril 3). A pesar que se realizaron transfecciones de epimastigotes con la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* en 7 oportunidades, en ninguna de las inmunodetecciones realizadas se confirmó la expresión la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 recombinante.

4.2.2 Expresión de la proteína N-cMyc-TcAP1 en epimastigotes transfectados

La comprobación de la expresión de la proteína N-cMyc-TcAP1 (polipéptido esperado de 417 aminoácidos y masa molecular estimada de 43 kDa) se evaluó mediante ensayos de *Western blot* sobre homogeneizados de proteínas totales de parásitos controles sin transfectar y parásitos transfectados con el vector *pTREX-cmyc-tcap1*. Para tales efectos, se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-cMyc y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. En la **Figura 8A** se muestra el resultado de estos experimentos. En esta oportunidad, el anticuerpo primario anti-cMyc reconoce una única banda de masa de entre ~40 kDa y ~55 kDa en el homogeneizado de proteínas totales de parásitos transfectados con la construcción *pTREX-cmyc-tcap1* (**Figura 8A**, carril 2). Esta banda no se encuentra presente en el carril correspondiente al homogeneizado de parásitos control sin transfectar (**Figura 8A**, carril 1), aunque presenta una banda de menor masa correspondiente a un error experimental. Como control de carga para este ensayo de *Western blot*, se verificó los niveles de expresión de la proteína α -tubulina, empleando un anticuerpo monoclonal específico (**Figura 8B**).

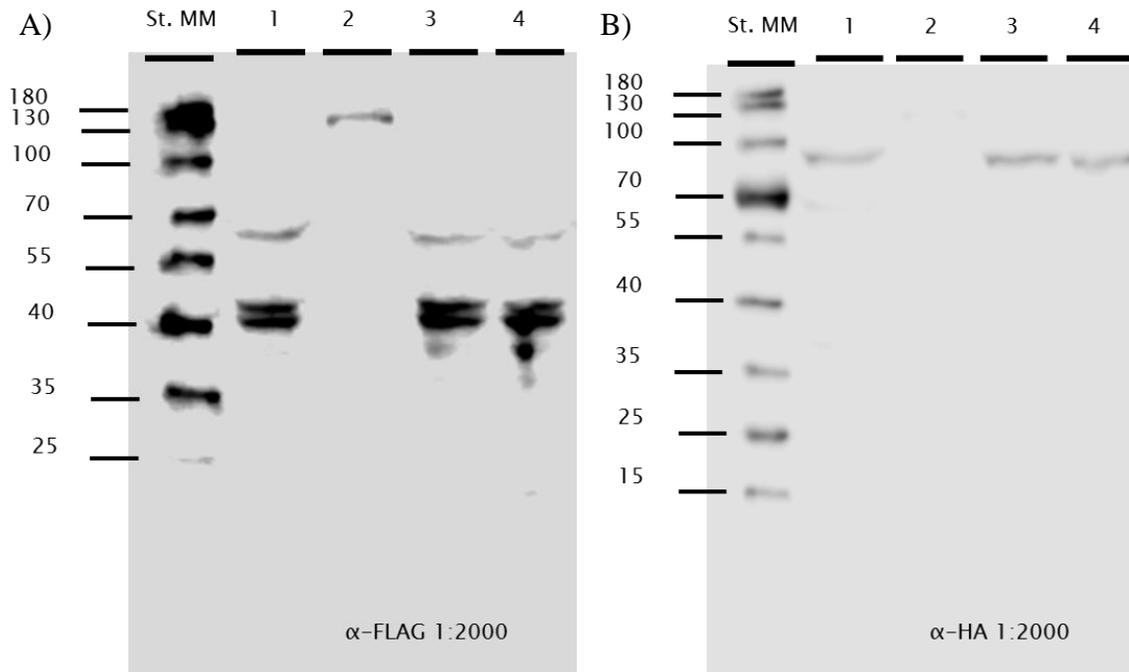


Figura 7. Detección de la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*.

A: Ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-FLAG (OriGen).
B: Ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-HA (Thermo Scientific).

Se utilizó un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson). Revelado mediante quimioluminiscencia en Scanner LI-COR.

- St MM: Marcador de tamaño molecular en kDa
- Carril 1: Epimastigotes control, sin transfectar.
- Carril 2: Control positivo del ensayo A, proteína con un epítoto FLAG, masa ~130 kDa.
- Carril 3: epimastigotes transfectados con la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* (vector vacío).
- Carril 4: epimastigotes transfectados con la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*.

No se obtuvieron epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* que expresaran la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1.

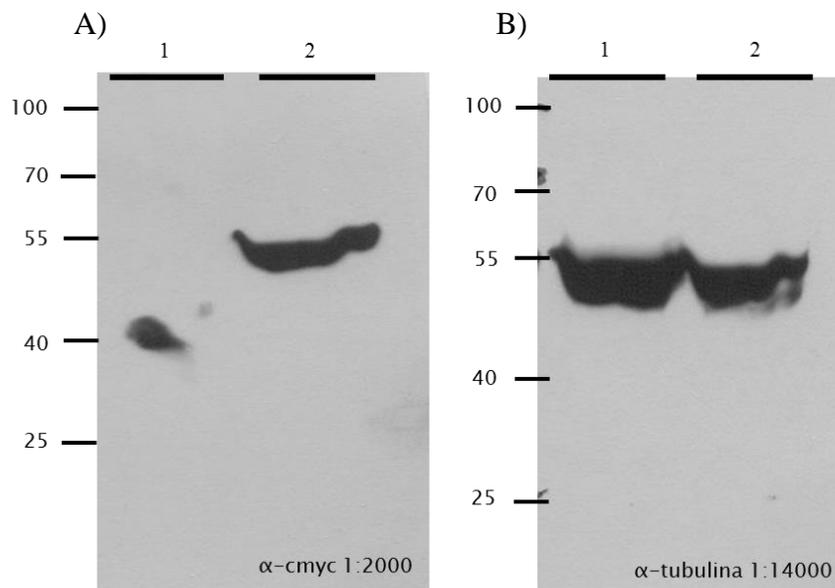


Figura 8. Detección de la proteína N-cMyc-TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi* transfectados con la construcción *pTREX-cmyc-tcap1*.

A: Ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-cMyc (Sigma)
B: Ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina (Sigma).

En ambos casos, se utilizó un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Revelado mediante quimioluminiscencia en films fotográficos.

- Carril 1: epimastigotes control, sin transfectar.

- Carril 2: epimastigotes transfectados con la construcción *pTREX-cmyc-tcap1*.

Se obtuvieron epimastigotes transfectados con *pTREX-cmyc-tcap1* que expresaran la proteína N-cMyc-TcAP1

Con estos resultados, se confirmó la obtención de epimastigotes que expresan la proteína de fusión N-cMyc-TcAP1.

4.3 Inmunoprecipitación de N-cMyc-TcAP1

Para purificar la proteína N-cMyc-TcAP1 junto a sus posibles proteínas asociadas, se utilizó el kit *Anti-cMyc Immunoprecipitation* (I0020-KT, Sigma). Estos ensayos se realizaron desde homogeneizados de proteínas totales de epimastigotes transfectados con la construcción *pTREX-cmyc-tcap1* y parásitos control sin transfectar. Las eluciones finales obtenidas desde la columna de afinidad, así como homogeneizados iniciales de proteínas totales de los parásitos (precarga), alícuotas obtenidas después de incubar los homogeneizados con la columna de afinidad (postcarga) y alícuotas obtenidas a partir del quinto lavado secuencial de la columna previo a la elución, se analizaron mediante ensayos de *Western blot* (**Figura 9A**) y posteriormente por separación electroforética en un gel desnaturalante de poliacrilamida 10% teñido con nitrato de plata (**Figura 9B**).

El ensayo de *Western blot* se llevó a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-cMyc y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. En la **Figura 9A** se muestra el resultado de este experimento. El anticuerpo identificó una banda cercana a los 43 kDa (masa de tamaño esperado) que correspondería a la proteína N-cMyc-TcAP1 tanto en la precarga (**Figura 9A**, carril 5), postcarga (**Figura 9A**, carril 6) y en la elución final (**Figura 9A**, carril 8). La presencia de TcAP1 en la postcarga indicó que no toda la proteína N-cMyc-TcAP1 presente en los homogeneizados se unió a la columna de afinidad. En ninguno de los carriles correspondientes al control sin transfectar se detectó la banda correspondiente a N-cMyc-TcAP1 (**Figura 9A**, carriles 1, 2, 3 y 4).

Los resultados de la separación electroforética mediante SDS-PAGE se muestran en la **Figura 9B**. Tanto para los parásitos control (**Figura 9B**, carriles 1-4), como para los parásitos transfectados (**Figura 9B**, carriles 5-8) se observaron una gran cantidad de proteínas presentes en las precargas (**Figura 9B**, carril 1 y 5) y postcargas (**Figura 9B**, carril 2 y 6). No se detectó la presencia de proteínas en los carriles correspondientes al quinto lavado (**Figura 9B**, carril 3 y 7). Al comparar las bandas de las proteínas presentes en el carril correspondiente a la elución obtenida desde parásitos control

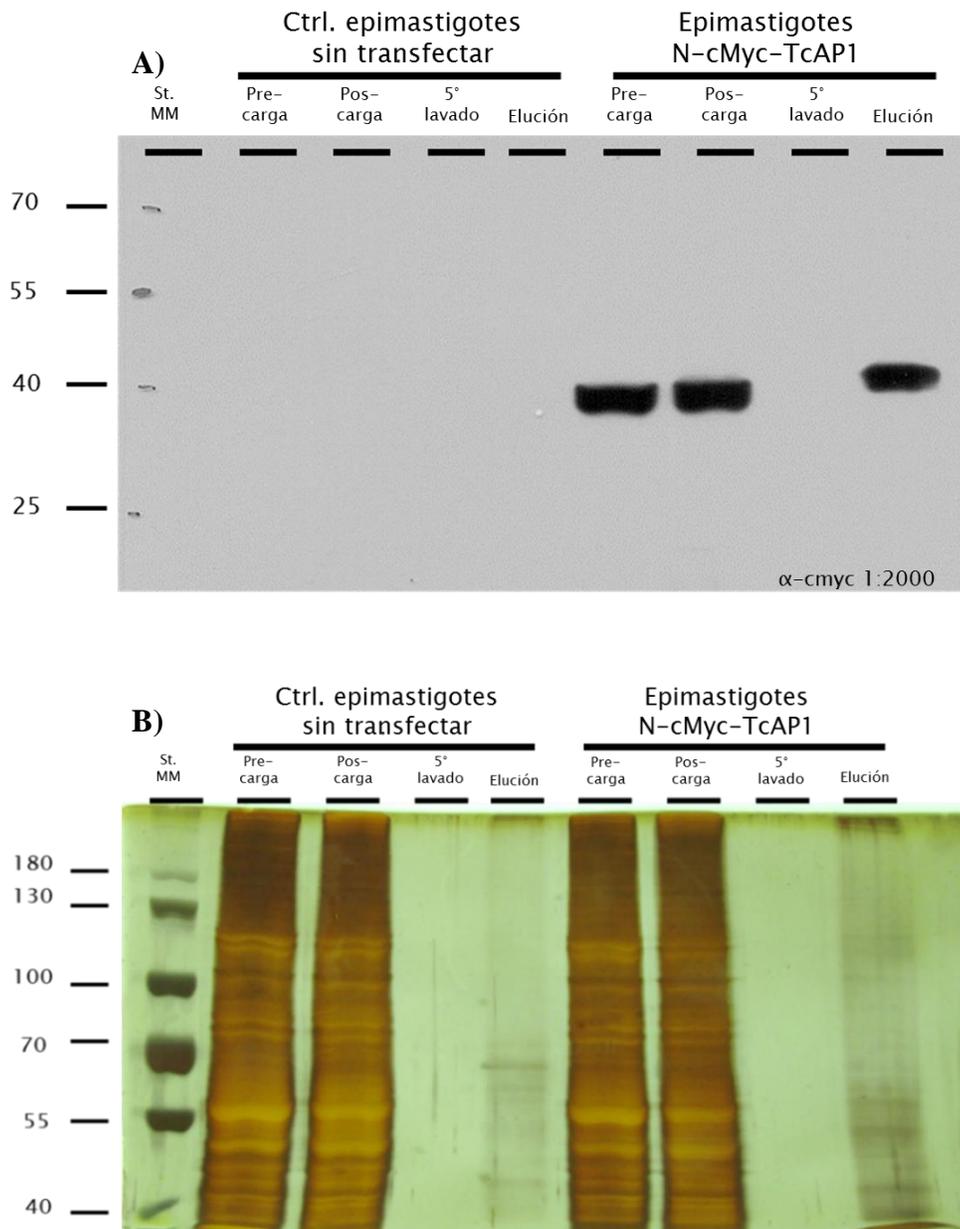


Figura 9. Análisis de la inmunoprecipitación de N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas

Purificación de la proteína N-cMyc-TcAP1 junto a sus posibles proteínas asociadas con el kit Anti-cMyc Immunoprecipitation I0020-KT (Sigma) desde homogeneizados de proteínas totales de parásitos control, sin transfectar (carriles 1 a 4) y de parásitos transfectados con el vector *pTREX-cmyc-tcap1* (carriles 5 a 8)

A: Ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-cMyc (Sigma) y anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano.

B: Separación electroforética en un gel desnaturalante de poliacrilamida al 10%, teñido con nitrato de plata

- St MM: Marcador de tamaño molecular en kDa.

- Carriles 1 y 5: homogeneizados iniciales de proteínas totales de los parásitos (precarga).

- Carriles 2 y 6: alícuotas obtenidas después de incubar los homogeneizados con la columna de afinidad (postcarga).

- Carriles 3 y 7: alícuotas obtenidas del 5to lavado secuencial de la columna previo a la elusión.

- Carriles 4 y 8: eluciones finales obtenidas desde la columna de afinidad.

(**Figura 9B**, carril 4) con el carril correspondiente a la elución obtenida desde parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1 (**Figura 9B**, carril 8), se observa un patrón electroforético con mayor cantidad de bandas presentes en la elución obtenida desde parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1. Este resultado dio el primer indicio que se logró purificar la proteína cMyc-TcAP1 junto a sus proteínas asociadas (**Figura 9 B**, carril 8).

Finalmente, se realizaron ensayos de electroforesis bidimensional de las proteínas obtenidas desde las eluciones de parásitos control sin transfectar (**Figura 10A**) y parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1 (**Figura 10B**). De esta forma, se pudo identificar 8 proteínas que solo se encuentran en las eluciones obtenidas parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1. Una de estas proteínas correspondería a TcAP1 y los siete restantes a proteínas asociadas. Se enumeraron los *spots* del 1 al 8 (**Figura 10 B**).

Teóricamente, el punto isoelectrico calculado para N-cMyc-TcAP1 es de 8,3 y presenta una masa molecular calculada de aproximadamente 43 kDa. En base a estos datos calculados, N-cMyc-TcAP1 debería corresponder a la proteína marcada con el número 4 (**Figura 10B**). Cinco de las proteínas presentes en la electroforesis bidimensional presentan un punto isoelectrico cercano a 9, mientras que tres de ellas presentan un punto isoelectrico de ~6. Se detallan los pesos moleculares aproximados en la **Tabla 4**, los cuales fluctúan entre ~25 kDa y ~170 kDa. En conclusión, se identificaron siete proteínas que podrían estar asociadas a N-cMyc-TcAP1.

4.4 Caracterización de las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1

Los *spots* correspondientes a las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1 se extrajeron del gel correspondiente a la segunda dimensión utilizando un bisturí y se enviaron a analizar mediante espectrometría de masa a la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de la ciudad de Montevideo, Uruguay.

Se recibieron los resultados de las secuenciaciones de los *spots*, pero la identificación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas enviadas no fue posible, debido a la alta presencia de queratina humana en las muestras, a pesar que se tomaron todas las precauciones para evitar las contaminaciones.

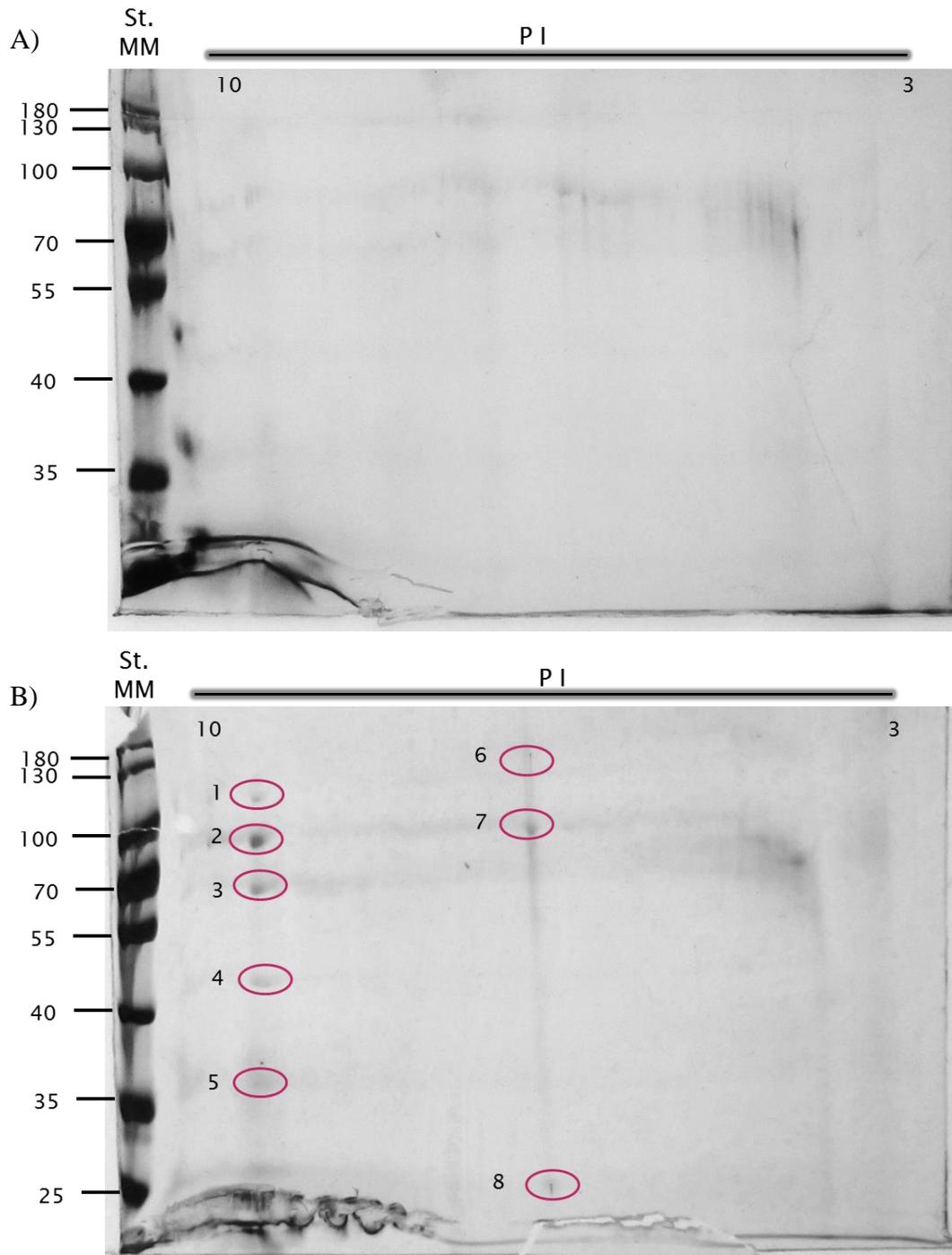


Figura 10. Patrón electroforético 2D de proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1.

Electroforesis bidimensionales de las proteínas presentes en las eluciones provenientes de la purificación de la proteína N-cMyc-TcAP1, junto a sus posibles proteínas asociadas, desde homogeneizados de proteínas totales de parásitos control sin transfectar (A) y de parásitos transfectados con el vector *pTRES-cmyc-tcap1* (B). A) y B) Geles desnaturalantes de poliacrilamida al 10% teñidos con nitrato de plata. En círculos morados, numerados de 1 a 8: N-cMyc-TcAP1 y proteínas asociadas.

Tabla 4. Caracterización del patrón electroforético 2D de proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1

Numeración <i>spots</i>	Punto isoelectrico (PI)	Masa molecular estimada (kDa)
1	9	120
2	9	100
3	9	70
4	9	45
5	9	37
6	6	170
7	6	100
8	6	25

A partir de la **Figura 10B**, se enumeraron de 1 a 8 las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1, que se detectaron exclusivamente en la electroforesis bidimensional de la elución de parásitos transfectados con el vector *pTREX-cmyc-tcap1*.

V. DISCUSIÓN

Durante su ciclo de vida, las diferentes formas celulares de *T. cruzi* se encuentran sometidas a ROS/RNS. En el sistema digestivo de los insectos vectores triatominos, los epimastigotes se enfrentan a moléculas resultantes de la degradación de la hemoglobina presente en la sangre ingerida por el parásito, que en presencia de H_2O_2 generan grandes cantidades de radical hidroxilo (OH^\cdot) (Graça-Souza *et al.*, 2006). A su vez, durante el inicio de la infección parasitaria en hospederos mamíferos, los tripomastigotes enfrentan la primera línea de defensa del sistema inmune innato: los macrófagos. Los tripomastigotes ingresan a los macrófagos mediante la formación de una vacuola parasitófora, en cuya membrana se ensamblan las diferentes subunidades del complejo NADPH oxidasa que genera altas concentraciones de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Piacenza *et al.*, 2009). Por otra parte, la activación de los macrófagos favorece la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) con la consecuente generación de NO. Esta molécula difunde desde el citoplasma hacia el interior de la vesícula parasitófora reaccionando con $O_2^{\cdot-}$ y llevando a la formación de $ONOO^-$ (Machado *et al.*, 2000; Piacenza *et al.*, 2009).

Diversos estudios indican que cardiomiocitos infectados crónicamente con la forma amastigote, presentan un estado de estrés oxidativo permanente (Zacks *et al.*, 2005) que es atribuible a un importante grado de infiltrado inflamatorio presente en el tejido miocárdico y a una disfunción mitocondrial que afecta a los cardiomiocitos parasitados (Gupta *et al.*, 2009). A pesar de estos importantes mecanismos de defensa generados por el mamífero hospedero en respuesta a la infección con *T. cruzi*, el parásito no es eliminado completamente, estableciéndose una infección crónica (Piacenza *et al.*, 2009).

Aunque todas las macromoléculas biológicas pueden ser blanco de daño por ROS/RNS, las consecuencias deletéreas primarias del estrés oxidativo probablemente provengan del daño al DNA (Riley, 1994; Wang *et al.*, 1998). Se han descrito más de 20 tipos de daño a las bases nucleotídicas del DNA luego de la exposición a ROS/RNS en células eucariontes (Slupphaug *et al.*, 2003).

En eucariontes, el daño oxidativo al DNA es reparado principalmente por la vía de reparación por escisión de bases o vía BER (Robertson *et al.*, 2009; Zarkov, 2008). La vía BER es un mecanismo altamente conservado en organismos eucariontes. Diversos estudios realizados en levaduras y algunos metazoos indican que el daño oxidativo producido en las bases del DNA es reparado principalmente mediante esta vía (Hegde *et al.*, 2008; Zharkov, 2008; Robertson *et al.*, 2009). En *T. cruzi* se ha identificado y detectado la actividad de una serie de enzimas que participan en la vía BER de reparación del DNA, tales como una uracil-DNA glicosilasa, la proteína PARP y la DNA-glicosilasa TcOgg1 (Furtado *et al.*, 2012; Fernández-Villamil *et al.*, 2008; Fárez-Vidal *et al.*, 2001). También se han identificado DNA polimerasas (TcPol β y K, entre otras) (Maldonado *et al.*, 2015; Rajão *et al.*, 2009) y DNA ligasas (DNA ligasa III, entre otras) (Grynberg *et al.*, 2012). La presencia y actividad de la DNA glicosilasa TcNTH1, la Flap endonucleasa TcFEN1, así como las endonucleasas AP TcAP1 y TcAP2 han sido recientemente caracterizadas en nuestro laboratorio (Ponce *et al.*, 2016; Ormeño *et al.*, 2016; Sepúlveda *et al.*, 2014).

La endonucleasa apurínica/apirimidínica APE1 humana pertenece a la subfamilia de las endonucleasas AP Exo III (descrita en *E. coli*), cuya familia incluye a Exo A (*Streptococcus pneumoniae*) y Rrp1 (*Drosophila melanogaster*), entre otras (Dyrkheeva *et al.*, 2016). La endonucleasa AP TcAP1 de *T. cruzi*, ortóloga de APE1 humana, pertenecería a esta familia (Sepúlveda *et al.*, 2014) y se ha demostrado que la complementación de cepas de *E. coli* carentes de Exo III con el gen que codifica la proteína TcAP1 les confiere resistencia frente a agentes oxidantes y alquilantes (Pérez *et al.*, 1999). Además, se ha establecido que la sobreexpresión de TcAP1 incrementa la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes expuestos a ROS/RNS (Sepúlveda *et al.*, 2014; Valenzuela, 2016). Por tales motivos, el estudio de las proteínas involucradas en la vía BER de *T. cruzi* y particularmente de la endonucleasa AP TcAP1, ha sido el foco de estudios en los últimos años en nuestro laboratorio. Esto, con la finalidad de comprender uno de los mecanismos celulares y moleculares desarrollados por el parásito para establecer una infección exitosa en un ambiente comúnmente desfavorable para muchos microorganismos (Sepúlveda *et al.*, 2014; Cabrera *et al.*, 2011; Valenzuela, 2016).

APE1 humana se expresa constitutivamente en cantidades de $\sim 0,35-7 \times 10^6$ moléculas/célula (dependiendo del tejido) y se localiza principalmente en el núcleo celular, aunque también se ha detectado en el citoplasma y las mitocondrias (Dyrkheeva *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2014). Aunque TcAP1 se expresa de manera constitutiva, solo ha sido posible detectarla en el núcleo de todas las formas celulares de *T. cruzi* (epimastigote, amastigote y tripomastigote) (Sepúlveda *et al.*, 2014; Valenzuela, 2016).

APE1 es una proteína clave dentro de la vía BER de mamíferos ya que, además de cumplir su función de endonucleasa AP, interactúa y regula la actividad de diversas enzimas que participan de esta vía. Así, en etapas tempranas de la vía BER, APE1 permite la disociación del complejo DNA/uracil-glicosilasa e induce la expresión y actividad de las DNA glicosilasas/liasas OGG1 y NTH1 (Dyrkheeva *et al.*, 2016). APE1 también participa en las etapas finales de la vía BER facilitando la unión de la DNA polimerasa β a los sitios AP producidos y estimulando tanto la actividad de la enzima FEN-1 (que permite la remoción de *flaps* o alerones de DNA generados en la vía larga de BER), como la actividad de la DNA ligasa I. La interacción proteína-proteína entre APE1 y las enzimas que participan de la vía BER, así como la estimulación que ejerce APE1 en la actividad DNA glicosilasa, DNA liasa, DNA polimerasa y DNA ligasa, reflejan la importancia de esta enzima en la coordinación de las diferentes etapas de esta vía de reparación del DNA para lograr su eficiencia óptima (Dyrkheeva *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2015; Thakur *et al.*, 2014). Hasta la fecha, no se ha descrito interacciones proteína-proteína entre enzimas de la vía BER en *T. cruzi*.

Por otra parte, APE1 humana también interactúa con proteínas no relacionadas con la vía BER, tales como TFB1 (regulador transcripcional de la vía NER), RSSA, RLA0 y PRP19 (proteínas que participan del ensamblaje del ribosoma y maduración del mRNA en citoplasma), Hsp70, Tmod3, GAPDH, la isoforma 3 de la cadena de tropomiosina α y proteínas reguladoras de la propia APE1, como MDM2 (involucrada en la ubiquitinación de APE1) y GADD45A (que modula la actividad de APE1), entre otras (Thakur *et al.*, 2015). Además, aparte de actuar como la principal endonucleasa AP de la vía BER, APE1 humana (también conocida como Ref-1 o *factor efector redox-1*)

participa como un co-activador redox de diferentes factores de transcripción como EgR-1 (*Early growth response protein-1*), NFκ-B, p53, HIF-1, CREB, AP-1 y Pax, entre otras. Esta actividad es regulada principalmente mediante modificaciones postraduccionales de APE1 (acetilaciones, fosforilaciones, sumoilaciones y proteólisis, entre otras) (Thakur *et al.*, 2015; Tell *et al.*, 2009).

A pesar que la función de APE1 como co-activador de factores de transcripción es de vital importancia en humanos (Thakur *et al.*, 2015), existiría muy baja a nula probabilidad de identificar este tipo de factores de transcripción asociados a la endonucleasa TcAP1 de *T. cruzi*, considerando que los tripanosomátidos presentan una regulación transcripcional diferente a eucariontes recientes. En tripanosomátidos, el mRNA generado es policistrónico; es decir, generan un largo transcrito que presenta la secuencia nucleotídica codificante de varias proteínas que, en la mayoría de los casos, no presentan relación funcional. Este pre-mRNA policistrónico es procesado en mensajeros monocistrónicos y sufren un proceso de maduración llamado *trans-splicing* que incorpora a todos los extremos 5' de los mRNAs maduros una secuencia común de 39 nucleótidos, conocida como *spliced leader* (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Solo en muy pocos casos los mRNAs son procesados por *cis-splicing*, considerando que la mayoría de los genes codificantes de proteínas en *T. cruzi* carecen de intrones (Günzl, 2010). Por otra parte, los numerosos esfuerzos destinados a identificar regiones promotoras en genes codificantes de proteínas han fracasado y solo ha sido posible describir unos pocos factores de transcripción basal y ningún factor de transcripción específico (Ekanayake *et al.*, 2011; Martínez-Calvillo *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2004). Sin embargo, sí se conocen los promotores de los genes ribosomales, transcritos por la RNA Pol I (Laufer *et al.*, 1999). Por todos estos antecedentes, actualmente se cree que la regulación de la expresión génica en trypanosomátidos es fundamentalmente de tipo post-transcripcional (De Gaudenzi *et al.*, 2011).

Considerando que hasta la fecha solo existen dos fármacos (Nifurtimox y Benznidazol) aprobados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, ambos con severos efectos adversos indeseados para el paciente e inefectivos en la fase crónica de la enfermedad (Murcia *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2013), es imperante la búsqueda de nuevos blancos

terapéuticos que permitan el desarrollo de compuestos más eficientes en la eliminación del parásito, así como más inocuos para el paciente. Es por esta razón que el estudio de las interacciones entre las proteínas de la vía BER, específicamente TcAP1 toma relevancia, ya que permitirá dilucidar aspectos relativos a la regulación de la actividad de esta endonucleasa AP en *T. cruzi* y ampliar el espectro de posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de futuros fármacos.

En esta memoria de título, se planteó desarrollar herramientas que permitan dilucidar la presencia de relaciones proteína-proteína de la endonucleasa TcAP1, mediante la generación de dos construcciones plasmidiales codificantes de TcAP1 fusionada a dos epítopes diferentes (por separado) en su extremo amino terminal, *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*.

En un comienzo se pensó y se diseñó un oligómero de 170 pb codificante de tres epítopes HA seguida de tres epítopes FLAG ((*ha*)₃-(*flag*)₃), ya que se tenía proyectado realizar una purificación en tándem o de tipo “*tag-tag*” con un kit comercial de Sigma (*FLAG HA Tandem Affinity Purification Kit*). Este kit dentro de sus especificaciones recomienda tener proteínas de fusión unidas a epítopes (HA)₃-(FLAG)₃ como mínimo, para asegurar la máxima retención por afinidad de los complejos epítopo-anticuerpo. Además, el uso de dos epítopes diferentes promovería de forma más eficiente la retención de las proteínas asociadas de manera exclusiva a TcAP1, descartándose las proteínas unidas de manera inespecífica a la resina o unidas inespecíficamente al epítopo HA o al epítopo FLAG. Por otra parte, al oligómero (*ha*)₃-(*flag*)₃ en su extremo 3’ se le agregó un sitio de corte para *XmaI* con el objetivo de mantener el mismo número de sitios de clonamiento dentro del nuevo plasmidio generado (*pTREX-(ha)₃-(flag)₃*) en vista de que el sitio de restricción *XbaI* del vector *pTREX* es utilizado para la incorporación de la secuencia (*ha*)₃-(*flag*)₃.

El vector de expresión *pTREX* descrito por Vásquez y Levin, derivado del vector pRIBOTEX (Vásquez y Levin, 1999), utiliza la secuencia del promotor de genes ribosomales reconocida por la RNA Pol I de *T. cruzi*, ya que no se conoce en el parásito las secuencias promotoras consenso descrita en otros organismos eucarióticos para la RNA Pol II. Por otra parte, contiene el gen de resistencia a ampicilina para la selección

de bacterias y el gen de resistencia a neomicina para la selección de *T. cruzi* transfectantes.

Para la selección de clones positivos a las reacciones de PCR de colonias del vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, no se utilizaron los partidores diseñados para amplificar el inserto, sino que partidores capaces de hibridar con secuencias nucleotídicas presentes en el plásmido *pTREX* (*pTREX-seq* y *pTREX-seq-rev*, ~200 pb de distancia). Esto explica la presencia de bandas inferiores a 400 pb en los ensayos destinados a detectar colonias positivas para *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* en el gel de agarosa de la **Figura 1C** (bandas ~200 pb, indicativas de ausencia del inserto). De esta forma, se catalogó como colonias positivas (con presencia del inserto *(ha)₃-(flag)₃*) a sólo 3 colonias en las que se detectó una banda de ~400 pb.

El vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, obtenido a partir de la inserción de la secuencia nucleotídica *tcap1* en el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* no presentó muchos inconvenientes, ya que se amplificó el inserto *tcap1* a partir del plasmidio *pTREX-tcap1*, sintetizado con anterioridad en nuestro laboratorio (Delgadillo, 2011). La detección de colonias positivas para el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, dio sólo 1 colonia positiva (~1400 pb, **Figura 3C**) utilizando los mismos partidores plasmidiales (*pTREX-seq* y *pTREX-seq-rev*) de las reacciones de PCR de colonias de *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*.

Se confirmó el correcto marco de lectura de los vectores *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* y *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* (**Figuras 2 y 4**, respectivamente), mediante alineamiento con la secuencia nucleotídica codificante esperada (**Figura 1 A, Figura 3A**), utilizando el programa Clustal Omega. A pesar de evidenciarse algunos *gaps* en los alineamientos, éstos no generaron cambios en el marco de lectura.

La decisión de generar el vector *pTREX-cmyc-tcap1* surgió debido a que no se estaban obteniendo epimastigotes transfectantes que expresaran la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1. Para ello, se sintetizó un oligómero de 60 pb el cual contiene la secuencia nucleotídica codificante para el epítipo cMyc, seguida de una secuencia nucleotídica capaz de hibridar con el inicio de la secuencia codificante para TcAP1. Este oligómero fue utilizado como partidore sentido en la reacción de PCR destinada a amplificar la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1; el plasmidio *pTREX-tcap1*

fue utilizado como DNA molde (Delgadillo, 2011). Se obtuvieron varias colonias positivas para *pTREX-cmyc-tcap1* (**Figura 5B**), de las cuales 5 se secuenciaron y solo una dio el correcto marco de lectura (**Figura 6**).

A pesar que los análisis de secuencia de DNA de ambas construcciones indicaron una correcta inserción de los fragmentos nucleotídicos codificantes para las proteínas de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 y N-cMyc-TcAP1, solo se confirmó la expresión de la proteína N-cMyc-TcAP1, mediante ensayos de *Western blot*.

Se intentó verificar la expresión de la proteína de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 mediante *Western blot* con dos anticuerpos (uno anti-FLAG y otro anti-HA) en ensayos por separados. Al analizar estos resultados, se observa una unión inespecífica del anticuerpo primario anti-FLAG a proteínas parasitarias (**Figura 7A**) evidenciadas como bandas de 40, 45 y 65 kDa en las tres condiciones analizadas (epimastigotes control sin plasmidio, epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* y epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*). A pesar de que la proteína N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 posee una masa molecular de ~45kDa, no fue posible confirmar su expresión en el cultivo de epimastigotes transfectados con el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, ya que se repite el mismo bandeo en los homogeneizados de proteínas totales provenientes de ambos epimastigotes control (epimastigotes sin transfectar y transfectados con el plasmidio *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*). Se descarta que el anticuerpo no reconozca el epítipo FLAG, ya que detecta la proteína cargada como control positivo en el carril 2 (proteína de fusión de 130 kDa asociada a un epítipo FLAG). Además, se descarta que la unión inespecífica corresponda a una asociación generada directamente entre el anticuerpo secundario y proteínas parasitarias, puesto que al observar la **Figura 7B** (ensayo de *Western blot* en el que se utilizó un anticuerpo primario anti-HA y el mismo anticuerpo secundario) no se distingue el mismo bandeo que en la **Figura 7A**. Así, al utilizar el anticuerpo primario anti-HA se detectó la presencia de una banda inespecífica cercana a los 90 kDa en los carriles 1, 3 y 4 (epimastigotes control sin plasmidio, epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃* y epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, respectivamente). Los ensayos de *Western blot* en los que se utilizó el anticuerpo primario anti-HA

(Figura 7B), permitieron confirmar la ausencia de expresión de la proteína de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 en los epimastigotes transfectantes.

A pesar que se realizaron 7 ensayos sucesivos de transfección y selección con los plásmidos *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y su control *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, no se obtuvieron transfectantes que expresaran las respectivas proteínas. Para intentar solucionar este problema, se preparó antibiótico nuevo, se mantuvo un régimen más estricto en la manipulación de los parásitos y se transfectaron cultivos *stock* con epimastigotes descriegonizados nuevos. Aun así, no se tuvo el resultado esperado.

Dentro de las posibles explicaciones que se barajaron para intentar explicar la ausencia de la expresión de la proteína de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 en los epimastigotes transfectados con el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* o la incapacidad de detectar la expresión de la proteína utilizando las aproximaciones experimentales basadas en los anticuerpos anti-HA y anti-FLAG, se incluye:

i) la presencia de un codón de inicio de la traducción entre la secuencia codificante del epítipo N-(HA)₃-(FLAG)₃ y la secuencia codificante para TcAP1. Es posible que el primer tRNA de inicio de la traducción se asocie al codón AUG perteneciente al inicio de la secuencia nucleotídica codificante para TcAP1, obviando el AUG correspondiente al inicio de la secuencia destinada a la generación del epítipo N-(HA)₃-(FLAG)₃. Esto explicaría por qué en los ensayos de *Western blot* realizados con el anticuerpo anti-HA (Figura 7B) hay ausencia de la banda esperada correspondiente a N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 (~43 kDa). Como solución se plantea realizar una nueva clonación del inserto *tcap1* en el vector *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, usando un partidor sentido que no incluya la secuencia nucleotídica codificante para el codón AUG de inicio. Por otra parte, con el objetivo de corroborar esta posibilidad, se podría realizar un *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti-TcAP1 (disponible en nuestro laboratorio) usando lisados de parásitos transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, parásitos controles sin transfectar y como control positivo la endonucleasa AP TcAP1 purificada. Si hubiese expresión de la endonucleasa TcAP1 (carente del epítipo N-(HA)₃-(FLAG)₃, pero bajo el control de la región promotora presente en el

plasmidio) en los lisados de epimastigotes transfectados con *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*, la intensidad de la banda correspondiente a TcAP1 debiera verse incrementada en comparación con parásitos controles sin transfectar.

ii) que la secuencia nucleotídica codificante *(ha)₃-(flag)₃-tcap1* no se hubiera incorporado al genoma de *T. cruzi* o que la inserción de dicha secuencia se haya realizado una región de heterocromatina del parásito. Para el correcto funcionamiento del vector de expresión *pTREX* se espera su inserción en el genoma parasitario mediante recombinación homóloga. De esta forma, se plantea realizar una reacción de PCR utilizando partidores pertenecientes al plasmidio y DNA molde extraído de lisados de los epimastigotes transfectados con la construcción *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1*. Si se obtuviera los amplificadores esperados, se descartaría problemas en la inserción del plasmidio en el DNA de *T. cruzi*, aunque no se podría descartar una inserción en regiones silenciadas del genoma parasitario.

El diseño del vector *pTREX-cmyc-tcap1* surgió como una solución frente al hecho que no se estaba expresado la proteína de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 en epimastigotes de *T. cruzi*, por lo que se sintetizó un oligómero de 60 pb que incluía la secuencia codificante del epítipo cMyc y una región complementaria con el inicio de la secuencia codificante de TcAP1. Esto presentó una desventaja, ya que no se generó un vector control *pTREX-cmyc*. Al corroborar la expresión de N-cMyc-TcAP1 mediante *Western blot* (**Figura 8A**) se obtuvo solo una banda correspondiente a esta proteína de fusión (~53 kDa) (**Figura 8A**, carril 2), usando como control epimastigotes sin transfectar (**Figura 8A**, carril 1). En el control sin transfectar se detecta una banda (~40 kDa) la cual corresponde a un error de procedimiento ya que durante la exposición del film fotográfico con la membrana de nitrocelulosa (previamente incubada con los reactantes de revelado), hubo un desplazamiento del film por un pequeño lapso (inferior a 1 seg), que afectó el resultado del ensayo. Cabe destacar que el anticuerpo primario anti-cMyc no se une a otras proteínas, como lo ocurrido con los anticuerpos anti-FLAG y anti-HA (**Figuras 7A y 7B**).

Utilizando un kit comercial anti-cMyc de inmunoprecipitación se procedió a purificar N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas desde homogeneizados de proteínas totales de

epimastigotes transfectados con el vector *pTREX-cmyc-tcap1*. Como control se utilizó epimastigotes sin transfectar. Cabe mencionar que para la elución de N-cMyc-TcAP1 y sus proteínas asociadas retenidas en la *spin column*, no se utilizó el amortiguador provisto por el fabricante, sino que se usó un amortiguador suave sin sales, ya que con este amortiguador se obtuvo un mejor rendimiento en la elución de proteínas asociadas al epítipo cMyc en procedimientos anteriores (Pérez, 2016). Se realizó un *Western blot* de las diferentes etapas de la inmunoprecipitación, tanto de los parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1 y parásitos controles sin transfectar, es decir, pre-carga (lisado de parásitos), post-carga (proteínas que no fueron retenidas luego de la primera centrifugación), lavados de la columna (se realizaron 5 lavados y solo se utilizó el último lavado en el *Western blot*) y elución (**Figura 9**). Como se esperaba, se obtiene una sola banda correspondiente a la masa esperada para la proteína de fusión N-cMyc-TcAP1 en los carriles correspondientes a la inmunoprecipitación de epimastigotes que expresan N-cMyc-TcAP1 (**Figura 9**, carriles 5, 6 y 8) y ninguna en los de los parásitos control (**Figura 9**, carriles 1-4). A pesar que se detecta una gran cantidad de N-cMyc-TcAP1 en la pre y post carga, igualmente se retuvo una cantidad considerable de la proteína en la columna (**Figura 9**, carril 8). Cabe mencionar que hay una diferencia de ~5kDa en los carriles 5-6 con la banda del carril 8 de la **Figura 9** pudiendo deberse esta diferencia al uso del amortiguador de elución suave, el cual no contiene sales.

Por otra parte, al comparar los *Western blot* de la **Figura 8A** y **9**, existe una diferencia de ~10 kDa en la detección de N-cMyc-TcAP1 del *Western blot* de la **Figura 8A** carril 2, al compararlo con los carriles 5, 6 y 8 de la **Figura 9**. Esto pudo deberse a una diferencia en la corrida electroforética debido a diferencias en la composición del amortiguador de lisis utilizado en el ensayo de *Western blot* de la **Figura 8A**, en relación al buffer de lisis que utiliza el kit de inmunoprecipitación (CellLytic M Cell Lysis reagent), utilizado en la **Figura 9**, lo que modificaría su migración electroforética. Además, según literatura es posible tener una diferencia de entre 5-10 kDa de la masa molecular determinada teóricamente de la proteína objetivo.

Luego, se realizó una separación electroforética monodimensional y posterior tinción, cargando las mismas alícuotas provenientes de los diferentes pasos del ensayo de

immunoprecipitación (pre-carga, post-carga, lavado de la columna y elución). Como era de esperar, se obtuvo una gran cantidad de proteínas en la pre-carga y proteínas no retenidas en la post-carga en ambas condiciones (parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1 y parásitos control sin transfectar). Por otra parte, al contrastar los patrones electroforéticos de las eluciones obtenidas desde parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1 en relación al patrón observado para los parásitos control sin transfectar, se observaron bandas de proteínas que solo se encontraban en la elución de epimastigotes que expresan N-cMyc-TcAP1 dando indicio de la existencia de proteínas asociadas a la proteína de fusión, aunque no es posible afirmar que se asocian exclusivamente a TcAP1 (y no el epítipo cMyc), ya que no se tiene un control de epimastigotes que expresen solo el epítipo cMyc. A pesar de esto, fue posible detectar proteínas parasitarias que se asocian a la agarosa de la resina *cMyc-agarose*, realizando una comparación del patrón de bandeado electroforético de las elución obtenida desde parásitos control sin transfectar con el patrón de bandeado electroforético de la elución obtenida desde los parásitos transfectados que expresan N-cMyc-TcAP1.

Como fue difícil extraer las proteínas asociadas a N-cMyc-TcAP1 en geles resueltos mediante SDS-PAGE, se realizó una electroforesis bidimensional por dos razones: i) para tener una mejor separación electroforética de las proteínas, y ii) para caracterizarlas por punto isoelectrico y masa molecular. Se detectaron algunas proteínas presentes solo en la electroforesis de la elución de la inmunoprecipitación de parásitos que expresan N-cMyc-TcAP1, al compararla con la elución de los parásitos sin transfectar (**Figura 10A y B**). Los puntos isoelectricos de las proteínas enumeradas en la **Figura 10B** (parásitos que expresan la proteína de fusión) son ~6 y ~9 (**Tabla 4**). Cerca del pH 5 se encuentra una región donde se detectan tanto proteínas de la elución de los parásitos control, como de los que expresan N-cMyc-TcAP1, las que corresponderían a proteínas parasitarias que se unen inespecíficamente a la resina *cMyc-agarose*.

Al recibir el análisis de espectrometría de masa de los 8 *spots* (**Figura 10 B**) extraídas de la electroforesis bidimensional de la elución de parásitos que expresan N-cMyc- TcAP1, no fue posible identificar las proteínas correspondientes debido a la alta presencia de

queratina humana, a pesar de haber realizado la extracción de estos *spots* con todas las precauciones recomendadas.

En suma, fue posible generar herramientas para que a futuro permitan identificar proteínas parasitarias que interaccionan con la endonucleasa AP TcAP1. Cabe destacar que sí se logró detectar proteínas que solo se encuentran asociadas a N-cMyc-TcAP1 mostrando por primera vez en *Trypanosoma cruzi* la existencia de proteínas que podrían estar siendo moduladas y/o que modulan la actividad de la endonucleasa AP TcAP1.

VI. CONCLUSIONES

Mediante clonación fue posible generar los vectores de expresión *pTREX-(ha)₃-(flag)₃*, *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* y *pTREX-cmyc-tcap1*.

Se obtuvieron epimastigotes que expresan la proteína de fusión N-cMyc-TcAP1 a partir del plásmido *pTREX-cmyc-tcap1*.

No se obtuvieron epimastigotes que expresaran la proteína de fusión N-(HA)₃-(FLAG)₃-TcAP1 a pesar de realizar el procedimiento de transfección con el plásmido *pTREX-(ha)₃-(flag)₃-tcap1* en varias oportunidades.

Mediante ensayos de inmunoprecipitación, se aislaron proteínas asociadas a la endonucleasa AP TcAP1 de *T. cruzi*. No obstante, al momento no es posible descartar que alguna de estas proteínas se encuentre asociada al epítipo cMyc, por falta del control positivo de epimastigotes que expresen solo el epítipo cMyc.

A pesar de los inconvenientes presentados se generaron herramientas que permitirán identificar las proteínas asociadas a la endonucleasa AP TcAP1 de *Trypanosoma cruzi* y así, determinar interacciones proteína-proteína de TcAP1 con otras proteínas de la vía BER, entre otras.

VII. REFERENCIAS

- Aldunate C. (2016). Participación de la enzima FLAP endonucleasa TcFEN1 en la resistencia de *T. cruzi* frente al daño oxidativo sostenido. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario de la Universidad de Chile.
- Apt W, Heitmann G, Jercic L, Jofré M, Muñoz C, Noemí H, San Martín V, Sapunar P, Torres H, Zulantay A. (2008). Guidelines for the Chagas disease. Part I. Introduction and epidemiology. *Revista Chilena de Infectología*. 25 (3): 189-193.
- Apt W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Desing, Development and Therapy*. 4:243–253.
- Araújo P, Teixeira S. (2011). Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 106(3): 257-266.
- Atwood J, Weatherly D, Minning T, Bundy B, Cavola C, Opperdoes F, Orlando R, Tarleton R. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 309:473-476.
- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real J, Palma S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*. 156: 1–16.
- 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.
- Castro J. (2014). Efectos tóxicos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: un problema frecuente en la quimioterapia de las enfermedades tropicales. *Ciencia e Investigación*. 64 (5):78-92.
- De Gaudenzi J, Noé G, Campos V, Frasc A, Cassola A. (2011). Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays in Biochemistry*. 51:31-46.
- Delgadillo J. (2011). Clonamiento, expresión y purificación de las endonucleasas apurínicas/apirimidínicas TcAP1 y TcAP2 de *Trypanosoma cruzi* en condiciones nativas. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario de la Universidad de Chile.
- Demple B, Herman T, Chen DS. (1991). Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 11450–11454.
- Demple B, Sung J. (2005). Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair*. 4(12): 1442-1449.

- Ekanayake D, Minning T, Weatherly B, Gunasekera K, Nilsson D, Tarleton R, Ochsenreiter T, Sabatini R. (2011). Epigenetic regulation of transcription and virulence in *Trypanosoma cruzi* by O-linked thymine glucosylation of DNA. *Molecular and Cellular Biology*. 31(8): 1690-1700.
- Fárez-Vidal ME, Gallego C, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D. (2001). Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from *Trypanosoma cruzi* and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic Acids Research*. 29(7):1549-1555.
- Fernández Villamil SH, Baltanás R, Alonso GD, Vilchez SC, Torres HN, Flawiá MM. (2008). TcPARP: a DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*. 38(3-4):277-287
- Fleck O, Nielsen O. (2004). DNA repair. *Journal of Cell Science*. 117: 515-517.
- Furtado C, Kunrath-Lima M, Rajão MA, Mendes IC, de Moura MB, Campos PC, Macedo AM, Franco GR, Pena SD, Teixeira SM, Van Houten B, Machado CR. (2012). Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*. 7(8): e42484.
- Goes G, Rocha P, Diniz A, Aguiar P, Machado C, Vieira L. (2016). *Trypanosoma cruzi* needs a signal provided by reactive oxygen species to infect macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(4): e0004555
- Graça-Souza A, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva G, Braz G, Paes M, Sorgine M. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 322-35.
- Grynberg P, Passos-Silva D, Mourão M, Hirata R, Macedo A, Machado CR, Castanheira D, Franco G. (2012). *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. *PLoS ONE*. 7(1): e29596.
- Günzl A. (2010). The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryotic Cell*. 9(8):1159-1170.
- Gupta S, Wen J, Garg N. (2009). Oxidative stress in Chagas disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009:1-8.
- Hegde M, Hazra T, Mitra S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research-Nature*. 18: 27-47.
- ISP. (2014). Vigilancia para Enfermedad de Chagas 2005 - 2013: Componente vectorial. Instituto de Salud Pública de Chile. 4(6):1-16.
- Jalal S, Earley J, Turchi J. (2011). DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clinical Cancer Research*. 17(22): 6073-6984.

Kim H, Guo C, Thompson E, Jiang Y, Kelley M, Vasko M, Lee S. (2015). APE1, the DNA base excision repair protein, regulates the removal of platinum adducts in sensory neuronal cultures by NER. *Mutation Research*. 779: 96–104.

Laufer G, Schaaf G, Bollgönn S, Günzl A. (1999). In vitro analysis of α -Amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*. 19(8): 5466–5473.

Machado F, Martins G, Aliberti J, Mestriner F, Cunha F, Silva J. (2000). *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 102: 3003-3008.

Machado A, Gonçalves P, Grazielle V, Ramos F, Figueiredo E, Ribeiro S, Machado C. (2016). How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defense and DNA repair pathways. *Mutation Research*. 767: 8–22.

Magalhaes A, Charneau S, Paba J, Guércio R, Teixeira A, Santana J, Sousa M, Ricart C. (2008). *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. *Proteome Science*. 6(24): 1-12.

Maldonado E, Rojas DA, Moreira-Ramos S, Urbina F, Miralles VJ, Solari A, Venegas J. (2015). Expression, purification, and biochemical characterization of recombinant DNA polymerase beta of the *Trypanosoma cruzi* Tc I lineage: requirement of additional factors and detection of phosphorylation of the native form. *Journal of Parasitological Research*. 114(4):1313-1326.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda J, Florencio-Martínez L, Manning-Cela R, Figueroa-Angulo E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 525241.

Moncayo A, Silveira A. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 104. Suppl 1: 17-30.

Muñoz C, Zulantay I, Apt W, Ortiz S, Schijman A, Bisio M, Ferrada V, Herrera C, Martínez G, Solarib A. (2013). Evaluation of nifurtimox treatment of chronic Chagas disease by means of several parasitological methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (9). 4518–4523.

Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra M, Segovia M. (2013). Diagnosis and treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31 Supl 1:26-34.

Loebenberg D, Counelis M, Waitz J. (1975). Antibiotic G-418, a new micromonospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: antiparasitic activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7(6): 811-815.

Olea A. (2009). Zoonosis y enfermedades de transmisión vectorial. Boletín de Vigilancia en Salud Pública. 10 (25). ISSN 0717 – 392.

OMS. (2016). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana): Nota descriptiva n°340. Versión web: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/

OPS, Fundación mundo sano. (2007). La enfermedad de chagas: a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Organización Panamericana de la Salud. ID: lil-474064:1-267.

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.

Ortiz S, Zulantay I, Solari A, Bisio M, Schijman A, Carlier Y, Apt W. (2012). Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. Acta Tropica. 124: 243– 246.

Peluffo G, Piacenza L, Irigoien F, Alvarez M, Radi R. (2004). L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. Trends in Parasitology. 20: 363-369.

Pérez C. (2016). Evaluación de la participación de la fosforilación del residuo T132 de la histona H2A de *Trypanosoma cruzi* en la supervivencia del parásito frente a daño oxidativo al DNA. Tesis para optar al grado en magíster en Bioquímica Clínica de la Universidad de Chile.

Pérez J, Gallego C, Bernier-Villamor V, Camacho A, González-Pacanowska D, Ruiz-Pérez L. (1999). Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research. 27(3):771–777.

Piacenza L, Alvarez M, Peluffo G, Radi R. (2009). Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. Current Opinion in Microbiology. 12(4): 415-421.

Ponce I, Aldunate C, Valenzuela L, Sepúlveda S, Garrido G, Kemmerling U, Cabrera G, Galanti N. (2016). A Flap Endonuclease (TcFEN1) is involved in *Trypanosoma cruzi* cell proliferation, DNA repair, and parasite survival. Journal of Cellular Biochemistry 118:1722-1732.

Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases. (2): 92-100.

Rajão M, Passos-Silva D, DaRocha W, Franco G, Macedo A, Pena S, Teixeira S, Machado C. (2009). DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the

mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. *Molecular Microbiology*. 71(1):185-197.

Ramírez S. (2012). Participación de las DNA glicosidasas TcNTH1 y TcOGG1 de *Trypanosoma cruzi* en la resistencia al daño oxidativo del DNA. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario de la Universidad de Chile.

Riley P. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*. 65: 27-33.

Robertson A, Klungland A, Rognes T, Leiros I. (2009). DNA repair in mammalian: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Science*. 66: 981–993.

Robson C, Hickson I. (1991). Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Research*. 19: 5519–5523.

Ruan J, Arhin G, Ullu E, Tschudi C. (2004). Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 24(21):9610-9618.

Sepúlveda S. (2012). Evaluación de la participación de TcAP1 y TcAP2 en la vía de reparación por escisión de bases (BER) del DNA en *Trypanosoma cruzi* y su rol en la sobrevivencia del parásito frente a estrés oxidativo. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile.

Sepúlveda 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/apyrimidinic endonucleases in replicative and non-replicative forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cellular Biochemistry*. 115:397-409.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan H. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. (1-2):231-251.

Tell G, Quadrioglio F, Tiribelli C, Kelley M. (2009). The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11 (3): 601-619.

Thakur S, Sarkar B, Cholia R, Gautam N, Dhiman M, Mantha A. (2014). APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. *Experimental and Molecular Medicine*. 46: e106.

Thakur S, Dhiman M, Tell G, Mantha A. (2015). A review on protein–protein interaction network of APE1/Ref-1 and its associated biological functions. *Cell Biochemistry and Function*. 33: 101–112.

Toso A, Vial F, Galanti N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Médica de Chile*. 139: 258-266.

Valenzuela L. (2016). Sobreexpresión de la endonucleasa apurínica/apirimidínica TcAP1 y los dominantes negativos TcAP1DN y hAPE1DN en tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*: evaluación de la invasión en cultivos celulares y viabilidad parasitaria frente a daño oxidativo. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias de la Universidad de Chile.

Vasquez M, Levin M. (1999). Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*. 239(2):217-225.

Wang D, Kreuzer DA, Essigmann JM. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 400: 99-115.

Yun O, Lima M, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, Roddy P, Parreño F, Albajar P, Palma P. (2009). Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala and Bolivia: 10-year experience of Médicins Sans Frontieres. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3: e488.

Zacks M, Wen J, Vyatkina G, Bhatia V, Garg N. 2005. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 77(4): 695-715.

Zarkov O. (2008). Base excision DNA repair. *Cell and Molecular Life Sciences*. 65:1544-1565.